



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E
CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA-DIMED

Direttore: Prof. R. Vettor

CLINICA MEDICA I

Responsabile: Prof.ssa Maria Luigia Randi

TESI DI LAUREA

Valutazione del rischio cardiovascolare nell'eritrocitosi
idiopatica: studio di un'ampia casistica monocentrica

Relatore: Prof.ssa Irene Bertozzi

Laureanda: Vanessa Gamba

Anno Accademico 2022-2023

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE	5
1.1 Definizione.....	5
1.2 Storia dell’Eritrocitosi.....	6
1.3 Classificazione	7
1.3.1 Eritrocitosi Primarie Congenite	9
1.3.2 Eritrocitosi Primarie Acquisite	10
1.3.3 Eritrocitosi Secondarie Congenite	14
1.3.4 Eritrocitosi secondarie Acquisite.....	19
1.3.5 Eritrocitosi Idiopatiche	21
CAPITOLO 2 - SCOPO DELLO STUDIO.....	26
CAPITOLO 3 - PAZIENTI, MATERIALI E METODI	27
3.1 Pazienti.....	27
3.2 Analisi biomolecolari.....	28
3.3 Analisi statistiche	30
CAPITOLO 4 – RISULTATI	31
4.1 Analisi del rischio trombotico.....	32
4.1.1 Analisi della relazione tra stato mutazionale e rischio trombotico	36
4.2 Analisi del rischio emorragico	37
CAPITOLO 5 – DISCUSSIONE e CONCLUSIONI.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	45

RIASSUNTO

Introduzione L'eritrocitosi assoluta è caratterizzata da aumento dell'emoglobina (Hb) e/o dell'ematocrito (Ht) rispettivamente >165 g/L e $>49\%$ per i maschi e >160 g/L e $>48\%$ per le femmine (WHO 2016). Si definisce primaria quando vi è un difetto intrinseco alla cellula progenitrice eritroide midollare, e di queste la forma più studiata è la Policitemia Vera (PV), e secondaria quando vi è uno stimolo esterno al midollo osseo. Per entrambe le forme esistono cause congenite e acquisite. Alla fine di un accurato processo diagnostico, non è possibile trovare una causa eziologica in circa il 70% di pazienti con eritrocitosi e si parla perciò di Eritrocitosi Idiopatica (EI), la forma più frequente dopo le forme secondarie acquisite. Nel corso dei nostri precedenti studi, abbiamo dimostrato un minor rischio trombotico nella EI rispetto alla PV, ma comunque maggiore rispetto alla popolazione generale. Ad oggi poco è noto sul management delle EI ed in particolare sulle più appropriate scelte terapeutiche in questi pazienti.

Scopo dello studio Abbiamo studiato un'ampia coorte di pazienti con EI, valutando lo stato mutazionale, i parametri biochimici e clinici, in particolare gli eventi trombo-emorragici e i relativi fattori di rischio, e l'approccio terapeutico con l'obiettivo di definire il ruolo di un'accurata stratificazione del rischio cardiovascolare e fornire indicazioni terapeutiche.

Materiali e Metodi Abbiamo selezionato in modo retrospettivo 126 pazienti adulti, valutati presso il Nostro Centro dal 1998 ad oggi, affetti da eritrocitosi definita sulla base degli ultimi criteri WHO. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad analisi molecolari, con pannello NGS ad hoc, comprendente 8 geni con un potenziale coinvolgimento nell'eritropoiesi, o con sequenziamento di Sanger. Per la maggior parte dei pazienti erano disponibili, inoltre, dati clinico anamnestici completi relativi al follow-up e agli eventi cardiovascolari.

Risultati. I nostri pazienti sono risultati in prevalenza maschi (85.7%) di età mediana 56.7 anni, con Ht ed Hb alla diagnosi rispettivamente $> 48\%$ e > 160 g/L, con restanti parametri emocromocitometrici nella norma. Abbiamo osservato 17 eventi trombotici in 15 pazienti che sono risultati mediamente più vecchi al momento della diagnosi di EI ($p= 0.004$) e presentavano, conta leucocitaria ($p= 0.009$), Hb ($p= 0.003$) ed Ht ($p= 0.002$) più elevati rispetto a coloro che non hanno avuto complicanze trombotiche. Tra i 15 pazienti che hanno avuto almeno un

evento trombotico: 10 non erano in terapia al momento dell'evento, 5 hanno presentato la trombosi pur essendo in terapia. Stratificando i pazienti in base alle terapie utilizzate, la sopravvivenza libera da trombosi è risultata significativamente migliore per i pazienti avviati a terapia antiaggregante in prevenzione primaria ($p=0.04$) rispetto ai non trattati, indipendentemente dalla combinazione con la salassoterapia. In analisi multivariata, una maggiore età alla diagnosi/primo contatto ($p=0.013$) e il mancato avvio di terapia antiaggregante in prevenzione primaria ($p=0.03$) si sono confermati fattori di rischio indipendenti per trombosi.

Nella sotto analisi dedicata allo stato mutazionale solo sui pazienti ($n=62$) con almeno una variante dimostrata tra i geni studiati è emerso che tra i 15 pazienti che hanno avuto un evento trombotico 10 presentavano almeno una variante genica e nello specifico 9 su 10 presentavano almeno una variante di *HFE*. Suddividendo i pazienti mutati in portatori e non di almeno una variante di *HFE*, abbiamo dimostrato una sopravvivenza libera da trombosi significativamente peggiore per i pazienti portatori di almeno una variante di *HFE* ($p=0.019$).

Discussione I nostri risultati confermano quanto abbiamo osservato in precedenza: in più della metà dei pazienti con EI è possibile identificare un'alterazione a carico di geni potenzialmente coinvolti nei meccanismi dell'eritropoiesi e nel metabolismo de ferro. Nel nostro studio emerge una possibile correlazione tra rischio trombotico e presenza di mutazioni a carico di *HFE* anche se non è ancora chiaro quale possa essere il meccanismo alla base di tale osservazione. Nei pazienti della nostra coorte la presenza di fattori di rischio cardiovascolare sembra non essere determinante nell'aumentato rischio trombotico. La profilassi antiaggregante, invece, sembra avere un effetto protettivo a fronte di un ematocrito che si mantiene al di sotto del 50% eventualmente tramite salassoterapia. Nonostante ciò, l'avvio della terapia con aspirina a basse dosi necessita di un'attenta valutazione della presenza fattori di rischio cardiovascolare e l'eventuale compresenza di fattori di rischio emorragico e perciò quanto osservato nel nostro studio non può rappresentare una solida indicazione ad avviare un trattamento antiaggregante in tutti i pazienti con EI al momento della diagnosi, sebbene ponga le basi per studi su casistiche più ampie, necessari per arrivare ad una migliore definizione dell'iter diagnostico e ad una corretta gestione terapeutica, con indicazioni più precise e personalizzate, dei pazienti con eritrocitosi idiopatica.

ABSTRACT

Introduction Absolute erythrocytosis is characterized by persistently raised hemoglobin (Hb) or hematocrit (Ht) respectively > 165 g/l and $> 49\%$ in men and > 160 g/l and $> 48\%$ in women (WHO 2016). It is primary when due to intrinsic defect of the hematopoietic stem cell, and the most studied form is Polycythemia Vera (PV), and secondary when there is an external stimulus to the bone marrow. Both comprehend congenital and acquired forms. Even when an accurate diagnostic investigation has been ruled out, it is impossible to find a definite cause in about 70% of cases, and these are defined Idiopathic Erythrocytosis (IE), the most frequent form of erythrocytosis. In our recent studies we described a reduced risk of thrombosis in IE patients compared with PV patients, but less is known about therapeutic options for IE.

Aim of the study We studied a large cohort of IE patients, evaluating mutational status, biochemical and clinical parameters, in particular thrombo-hemorrhagic events and the related risk factors, and the therapeutical approach with the aim to define the role of an accurate stratification of cardiovascular risk and provide therapeutic indications.

Materials and Methods We retrospectively selected 126 adult patients, evaluated in Our Center from 1998 to present, with erythrocytosis defined as the latest WHO criteria. All patients underwent molecular analyses, in most cases by an ad hoc NGS panel, including 8 genes with a potential involvement in erythropoiesis, and, in the remainder, by Sanger sequencing method. Complete clinical data at diagnosis and during follow-up were available for the most of our patients.

Results Our patients were mainly male (85.7%), median age at diagnosis of 56.7 years, with Ht and Hb at diagnosis respectively all above 48% and 160 g/L. We observed 17 thrombotic events in 15 patients. These patients were older at the time of diagnosis of IE ($p= 0.004$) and had higher leukocyte count ($p= 0.009$), Hb ($p=0.003$) and Ht ($p= 0.002$) than the patients who did not experienced thrombosis. Among the 15 patients who had at least one thrombotic event, 10 were not treated at time of event, 5 had thrombosis despite being on therapy. Stratifying patients on the basis of therapeutical approach, the thrombosis-free survival was significantly better for patients treated with low-dose aspirin as primary prevention ($p= 0.04$) compared with untreated ones, regardless of the combination or not with

venesection. In multivariable analysis, an older age at diagnosis/first contact ($p=0.013$) and the non-administration with antiplatelet therapy in primary prevention ($p=0.03$) were confirmed as independent risk factors for thrombosis.

We performed an analysis dedicated to the subset of patients ($n=62$) with at least one detectable variant among the investigated genes. We found that among the 15 patients who had a thrombotic event, 10 had at least one gene variant. Moreover, 9 out of these 10 patients had at least one *HFE* mutation. Thrombosis-free survival was significantly poorer for patients carrying at least an *HFE* variant when compared to all the other mutated patients with a non-*HFE* mutation ($p=0.019$).

Discussion The results of the present study confirm our previously observation that an alteration of genes potentially involved in the mechanisms of erythropoiesis and iron metabolism is detectable in more than a half of patients with IE. We found a correlation between thrombotic risk and the presence of mutations in *HFE* gene, although the mechanism behind this observation is still unclear. In the current literature there are no guidelines about the correct diagnosis and therapy in patients with IE, therefore there are no clear indications for the use of venesection and antiplatelet drugs in these setting of patients. We observed that the presence of cardiovascular risk factors does not affect thrombotic risk in patients with IE. On the contrary, treatment with antiplatelet drugs in primary prevention results to be protective against thrombosis in IE patients, considering that in all of them, hematocrit has been maintained below 50% with or without venesection. Despite this observation, starting a low-dose aspirin treatment requires careful evaluation of the presence of cardiovascular risk factors and bleeding risk factors. Maybe an antiplatelet treatment has to be recommended in all IE patients at time of diagnosis when other cardiovascular risk factors are present and there are not strong contraindications due to a significantly augmented bleeding risk. Although our data are limited by the small number of patients and the retrospective design of the study, they can be the basis to propose studies on larger series that can drive to a better knowledge on diagnostic workup and a validated therapeutical approach in patients with idiopathic erythrocytosis.

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

1.1 Definizione

Un adulto in media produce circa 2.4 milioni di globuli rossi (GR) al secondo. La principale sede di produzione è il midollo osseo contenente le cellule staminali pluripotenti che si differenzieranno in progenitore mieloide, eritroblasto e successivamente in GR. I GR sono cellule senza nucleo, che mancano della maggior parte degli organuli e che contengono grandi quantità di emoglobina (Hb) (1), una proteina contenente ferro, responsabile del trasporto di ossigeno ai tessuti. L'ormone che regola la produzione di globuli rossi e di emoglobina è l'eritropoietina (EPO), prodotta principalmente dalle cellule interstiziali peritubulari del rene e in minor misura dal fegato (2).

Con il termine eritrocitosi si definisce una condizione clinica caratterizzata da un'espansione del compartimento eritroide con conseguente aumento dei valori di Hb e /o ematocrito (Ht) al di sopra dei range di normalità rispetto a soggetti di pari età e sesso. Tuttavia, vanno considerate anche altre condizioni nell'inquadramento di un'eritrocitosi, prima tra tutte l'altitudine (la vita in montagna determina un aumento fisiologico dell'emoglobina), l'etnia (i livelli medi di emoglobina nei soggetti di etnia nera sono mediamente inferiori) o le abitudini di vita (per esempio l'eritrocitosi spuria dei fumatori). Inoltre, l'eritrocitosi può essere relativa o assoluta. Nella forma relativa l'aumento della massa eritrocitaria non è reale, ma relativo a una riduzione della massa plasmatica (grave disidratazione, diuretici, iperdiaforesi, diarrea, vomito, ustioni). L'eritrocitosi assoluta è invece caratterizzata da un incremento assoluto della massa eritrocitaria al di sopra del 125% del valore predetto per sesso e massa corporea (3). Non si può assumere una diretta correlazione tra valori di massa eritrocitaria e valori di Hb e/o Ht, ma la presenza di un Ht superiore al 60% nell'uomo e al 56% nella donna è sufficiente, di per sé, a configurare un quadro di eritrocitosi assoluta (4).

I criteri del 2008 della WHO (World Health Organization) per la Policitemia Vera (PV), consideravano suggestivi di eritrocitosi valori di Hb al di sopra di 185 g/L nell'uomo e 165 g/L nella donna, e/o un incremento di Ht al di sopra del 52% nell'uomo e 48% nella donna. In questi casi, la misurazione della massa eritrocitaria

sarebbe necessaria per stabilire la presenza inequivocabile di una eritrocitosi assoluta (5), tuttavia, ad oggi risulta difficile avere una misura precisa della massa eritrocitaria e, come dimostrato negli studi di Johansson et al. un aumento di Hb ed Ht non sempre correla con un aumento della massa eritrocitaria, pertanto questa definizione è stata abbandonata (6). Nel 2016 sono stati rivisti i criteri WHO per la PV e sono state ridotte le soglie di emoglobina ed ematocrito che definiscono un'eritrocitosi portando i limiti di Hb al di sopra di 165 g/L nell'uomo e 160 g/L nella donna, e l'incremento di Ht al di sopra di 49% nell'uomo e 48% nella donna (7). Questo ha ampliato la quantità di individui in cui è formulabile una diagnosi di eritrocitosi con un'incidenza che variava dallo 0.3% con i criteri WHO 2008, al 3.4% con i criteri del 2016 (8).

1.2 Storia dell'Eritrocitosi

L'eritrocitosi fu descritta per la prima volta più di 150 anni fa da Denis Jourdanet che notò che il sangue dei soggetti che vivevano in alta quota, era più viscoso dei soggetti che vivevano a livello del mare (9). Egli notò che il sangue degli abitanti di montagna si presentava più denso e scuro, oltre che meno fluente; inoltre notò che tali pazienti presentavano alcune caratteristiche cliniche analoghe a quelle dei pazienti anemici residenti al livello del mare, come per esempio tachicardia, vertigini e sincopi (10). Circa 40 anni dopo Carnot e De Flandre ipotizzarono che la produzione di eritrociti fosse stimolata da un fattore umorale ematopoietico. Studi successivi dimostrarono inoltre che la produzione di questo fattore, identificato come eritropoietina, era stimolata dall'ipossia tissutale (11).

Nel 1892 L.H. Vaquez, un medico francese, descrisse la Policitemia vera (PV), o morbo di Osler-Vaquez, in una donna con una facies congesta e rubeosica, vertigini, dispnea, palpitazioni, epatosplenomegalia ed eritrocitosi. Questa malattia sarebbe stata successivamente (1951) inclusa da William Dameshek tra i "Disordini Mieloproliferativi", poi rinominati nel 2008 Neoplasie Mieloproliferative (MPNs) (12).

Alla fine degli anni '50 e negli anni '60, si iniziarono a studiare pazienti affetti da forme congenite di eritrocitosi; la prima mutazione germinale individuata responsabile di eritrocitosi fu un'emoglobinopatia con maggiore affinità per

l'ossigeno (13). Da quel momento, grazie alle nuove tecniche di biologia molecolare e sequenziamento, sono state scoperte numerose mutazioni responsabili di eritrocitosi, aumentando quindi il numero di cause riconosciute di tale patologia (14).

1.3 Classificazione

Una volta definita la presenza di eritrocitosi secondo i criteri sopra riportati, è importante andare ad identificarne la causa (Tabella I).

La prima grande suddivisione nella classificazione delle eritrocitosi prevede la distinzione tra forme relative, caratterizzate da un aumento relativo di Ht conseguente ad una diminuzione del volume plasmatico (alcune cause di diminuzione del volume plasmatico possono essere, ad esempio, le perdite gastrointestinali di fluidi o l'utilizzo di diuretici) (15) e forme assolute che a loro volta si distinguono in primarie, in cui vi è un difetto intrinseco alla cellula progenitrice eritroide midollare che è responsabile di una produzione incontrollata e sregolata di globuli rossi, e secondarie, in cui l'aumentata produzione di globuli rossi è stimolata da fattori esterni al compartimento eritroide.

Sia le forme primarie che quelle secondarie possono a loro volta essere suddivise in congenite ed acquisite (16). Le forme congenite sono caratterizzate dalla presenza di un'anomalia genetica identificabile, in genere si presentano in giovane età e spesso c'è una storia familiare di malattia.

Le forme congenite inoltre, si possono ulteriormente suddividere in base ai livelli di EPO: nei casi con EPO al di sotto della norma ritroviamo i difetti nella via di segnale dell'eritropoietina, mentre nei casi con EPO elevata troviamo le anomalie dell'oxygen sensing pathway (OSP) (17).

Una volta escluse tutte le forme di eritrocitosi note, si parla di Eritrocitosi Idiopatica (EI).

Tabella I: Classificazione delle principali forme di eritrocitosi

Eritrocitosi primaria

Congenita:

- Eritrocitosi familiare di tipo 1 (*EPOR*)

Acquisita:

- Policitemia Vera (*JAK2*)
-

Eritrocitosi secondaria

Congenita:

Difetti nella via dell'Oxygen Sensing Pathway

- Eritrocitosi familiare di tipo 2 (*VHL*)
- Eritrocitosi familiare di tipo 3 (*PHD2*)
- Eritrocitosi familiare di tipo 4 (*HIF2 α*)

Altri difetti

- Emoglobine ad alta affinità per l'ossigeno
 - Deficit di BPGM
 - Metaemoglobinemia
-

Acquisita:

Secrezione fisiologica di EPO

- Malattie croniche polmonari
- Difetti cardiaci con shunt dx-sx
- Elevata altitudine
- Sindrome delle apnee ostruttive notturne
- Stenosi dell'arteria renale
- Cisti renali
- Idronefrosi
- Eritrocitosi post-trapianto renale

Tumori EPO-secerenti

- Carcinoma renale a cellule chiare
- Emangioblastoma cerebellare
- Feocromocitoma/Paraganglioma
- Meningioma
- Leiomioma uterino

EPO esogena

- Uso medico o vulluttuario di EPO
 - Somministrazione di androgeni
-

Eritrocitosi idiopatica

1.3.1 Eritrocitosi Primarie Congenite

1.3.1.1 EPOR - Eritrocitosi congenita tipo 1 (ECYT1)

La causa principale di Eritrocitosi primaria congenita è una mutazione nel gene del recettore dell'eritropoietina (*EPOR*), anche denominata Eritrocitosi congenita tipo 1 (*ECYT1*). La trasmissione è autosomica dominante, ma sono state descritte anche forme de novo, sporadiche. Sono state identificate almeno 28 diverse mutazioni (non senso, missenso, piccole delezioni) a carico del gene *EPOR* (19p13.3-p13.2), tutte a carico dell'esone 8, che causano ipersensibilità all'EPO (14).

Tali mutazioni portano alla formazione di una proteina tronca in cui il sito di legame per JAK2, che ne determina la fosforilazione dell'estremità citoplasmatica, è preservato, mentre viene perso il sito di legame per la fosfatasi SHP1 che normalmente si lega alla porzione citoplasmatica di EPOR defosforilando sia JAK2 che il recettore che viene successivamente degradato. Queste mutazioni risultano quindi in un recettore costitutivamente attivo che stimola la produzione di globuli rossi attraverso le cellule progenitrici eritroidi ma che non ne permette la sua degradazione (5,18).

Il fenotipo eritrocitosico secondario alle mutazioni di *EPOR* può essere estremamente eterogeneo tra i pazienti con questa mutazione, anche all'interno dello stesso nucleo familiare, andando da pazienti con sintomi da iperviscosità quali cefalea persistente, epistassi, disturbi visivi, parestesie, intolleranza al caldo, vertigini e prurito ad altri con severe complicanze cardiovascolari come ipertensione arteriosa, emorragia cerebrale, trombosi venosa profonda, malattia coronarica e infarto miocardico (19–21).

1.3.1.2 LNK/SH2B3

Un'altra proteina con un ruolo inibitorio nei confronti della via JAK/STAT è la proteina LNK (o SH2B3): mutazioni di questa proteina sono state riscontrate in pazienti con eritrocitosi e potrebbero aver un ruolo nella genesi della stessa (22). Non è chiaro se queste mutazioni siano a carico della linea germinale, anche se mutazioni germinali di *LNK* sono state riscontrate in neoplasie mieloproliferative e

potrebbero dare eritrocitosi primaria tramite loss-of-function e quindi iperattivazione della via JAK/STAT (6,23,24).

1.3.2 Eritrocitosi Primarie Acquisite

1.3.2.1 Policitemia Vera

La Policitemia Vera è la forma più frequente di eritrocitosi primaria. La PV fa parte delle Neoplasie Mieloproliferative (MPN), un gruppo di patologie dovute a un disordine a carico della cellula staminale emopoietica che risulta in una proliferazione incontrollata della linea mieloide nel midollo osseo, con particolare coinvolgimento della linea eritroide nella PV. Nel gruppo delle MPN sono incluse anche altre entità: leucemia mieloide cronica, trombocitemia essenziale, mielofibrosi primaria, la leucemia neutrofilica cronica, leucemia eosinofila cronica, mastocitosi (7).

I primi criteri diagnostici per la PV sono stati definiti nel 1967 dal “Polycythemia Vera Study Group” (PVSG) e successivamente rivisti ed aggiornati dalla WHO nel 2001 e nel 2008. L’ultima versione dei criteri WHO risale al 2016 e sono quelli attualmente in uso (Tabella II) (25).

Tabella II: Criteri diagnostici per la PV (WHO 2018)

CRITERI MAGGIORI	livelli di Hb > 165 g/L nell'uomo, Hb > 160 g/L nella donna oppure Ht > 0.49 nell'uomo, Ht > 0.48 nella donna oppure aumento della massa eritrocitaria;
	ipercellularità alla biopsia midollare in riferimento all'età con panmielosi (crescita trilineare) che include proliferazione eritroide, granulocitica e megacariocitica con megacariociti pleomorfi e maturi*
	presenza di mutazione di <i>JAK2V617F</i> o <i>JAK2</i> esone 12
CRITERIO MINORE	livelli di EPO sierica inferiore alla norma

**La biopsia midollare non è richiesta in paziente con eritrocitosi assoluta definita come Hb > 185 g/L nell'uomo (Ht 0.55) o Hb > 165 g/L nella donna (Ht > 0.50) se presentanti il terzo criterio maggiore e il criterio minore. Tuttavia, lo stadio iniziale di mielofibrosi può essere rilevato solo tramite biopsia del midollo osseo e questo ritrovamento può essere predittivo di rapida evoluzione a mielofibrosi conclamata (mielofibrosi post-PV) (7)*

Gli attuali criteri uniscono caratteristiche cliniche, biomolecolari ed istologiche per formulare la diagnosi di PV. Per la diagnosi è richiesta la presenza di tutti e tre i criteri maggiori oppure dei primi due criteri maggiori e del criterio minore (7).

Una svolta fondamentale nella comprensione della patogenesi delle MPN è rappresentata dalla scoperta, nel 2005 e nel 2007, delle mutazioni a carico del gene *JAK2* (26–31). Tale gene codifica per una tirosinchinasi costitutivamente associata, in uno stato inattivato, ai domini intracitoplasmatici dei recettori di membrana delle citochine di tipo 1 (recettori per i fattori di crescita emopoietici, es. Eritropoietina, Trombopoietina); dopo il legame del recettore allo specifico ligando, *JAK2* va incontro ad attivazione e media la trasduzione intracellulare del segnale, fosforilando e attivando una serie di proteine latenti regolanti geni, le STAT, che migrano nel nucleo e stimolano la trascrizione di specifici geni bersaglio responsivi

ai fattori di crescita. In circa il 98% dei pazienti con PV è presente una mutazione somatica nella posizione 617 del dominio JH2 di *JAK2*, nell'esone 14, in cui la Fenilalanina è codificata in luogo della Valina (V617F); i restanti pazienti presentano alterazioni del dominio pseudochinasi di *JAK2* negli esoni dal 12 al 15.

In particolare, nei soggetti con mutazione *JAK2*V617F si verifica l'attivazione costitutiva della chinasi stessa tale per cui, in maniera autonoma e soprattutto EPO-indipendente, è in grado di attivare numerose vie di trasduzione del segnale a valle, incluse JAK-STAT, PI3K/Akt, e ERK1/2 MAPK, con effetti sulla trascrizione genica, sull'apoptosi, sul ciclo cellulare e sulla differenziazione cellulare (Figura 1) (18).

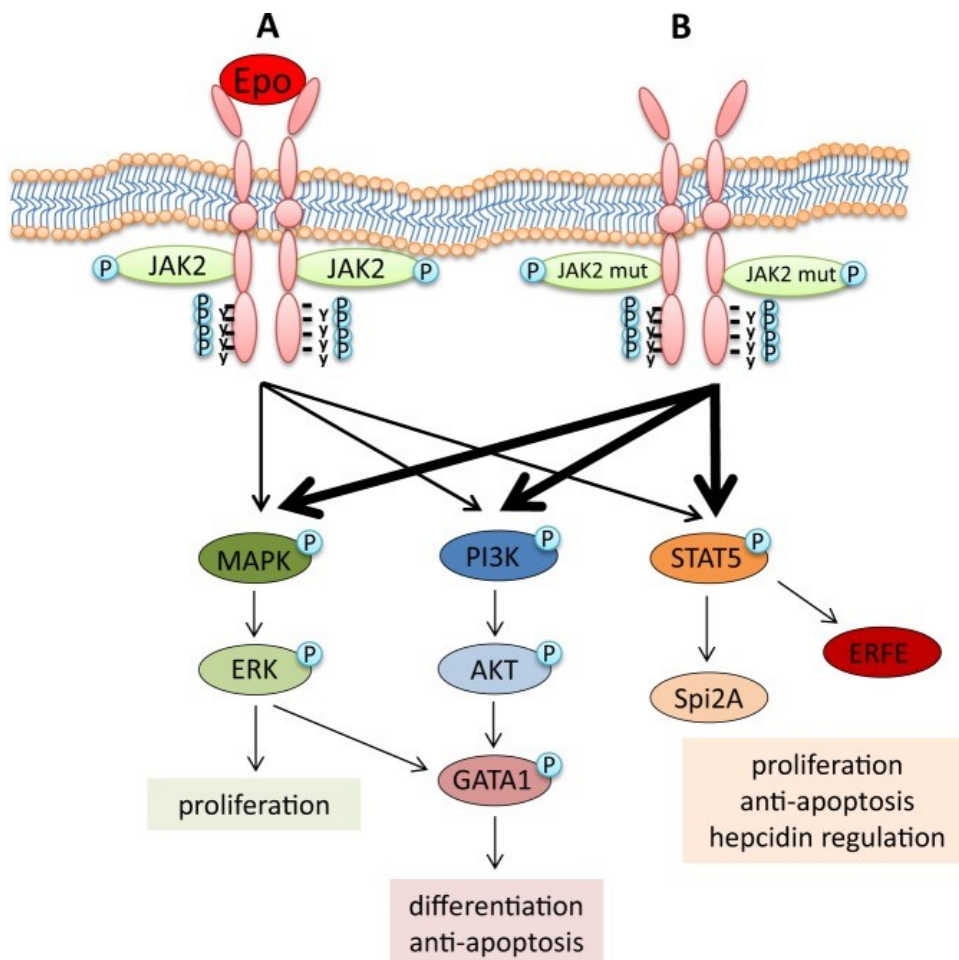


Figura 1: Vie di segnale di JAK2

La PV è una malattia tipica dell'età medio-avanzata, con mediana di età intorno ai 60-65 anni alla diagnosi; colpisce entrambi i sessi, con una lieve prevalenza maschile (2:1) (32). In circa il 10-20% dei casi, però, la diagnosi viene formulata in pazienti di età inferiore ai 40 anni, talora anche bambini (33). Studi epidemiologici su larghe popolazioni hanno riscontrato valori di incidenza, standardizzati per età, pari a circa 2-3 casi/100000 abitanti/anno (34), con una prevalenza pari a 30 casi/100000 soggetti sani (35).

I segni caratteristici della PV, che all'inizio della sua storia naturale può manifestarsi in forma asintomatica, sono la "facies rubra", acrocianosi, epatomegalia nel 33% dei casi e splenomegalia nel 67% dei casi, ed è comune la presenza di ipertensione (36). Le caratteristiche cliniche più importanti sono conseguenti all'aumento di massa eritrocitaria, in quanto aumenta la viscosità del sangue: il sintomo più ricorrente e invalidante è l'astenia che si manifesta nei primi stadi di malattia, e potrebbe esser dovuta a microtrombosi del circolo polmonare (37,38). Per quanto riguarda il microcircolo, sintomi suggestivi di PV sono cefalea, vertigini, tinnito, amaurosi, parestesie di mani e piedi, eritromelalgia e prurito acquagenico, quest'ultimo il più difficile da trattare e spesso definito come "insopportabile" (39,40). Nel 40% dei pazienti sono presenti disordini del macrocircolo (41). Gli eventi cardiovascolari più frequenti sono quelli arteriosi quali attacchi ischemici transitori (TIA), stroke e sindromi coronariche acute, seguono quelli venosi come trombosi venose profonde, embolia polmonare e tromboflebite superficiale (42). Trombosi rare, come la trombosi venosa cerebrale e le trombosi splancniche, sono presenti nella storia naturale della malattia, e sono più frequenti nei pazienti giovani (42,43). Le complicanze emorragiche sono meno comuni di quelle trombotiche: i sanguinamenti sono tipicamente di minore entità e includono epistassi, sanguinamento gengivale ed ecchimosi/ematomi. Sono rari i sanguinamenti gastrointestinali (38).

I pazienti con PV hanno una lieve riduzione dell'aspettativa di vita rispetto alla popolazione generale (44). Uno studio italiano condotto su 831 pazienti con PV e trombocitemia essenziale (ET) seguiti per un tempo mediano di 10 anni ha evidenziato che la spettanza di vita della PV è ridotta rispetto alla popolazione generale (45), in particolare il rapporto standardizzato di mortalità, ossia il numero di decessi osservati nella popolazione di pazienti rispetto a quelli attesi in una popolazione di riferimento, è risultato pari a 1.6 per la PV.

Dai dati disponibili dalla letteratura, i tassi di evoluzione in mielofibrosi e di trasformazione in leucemia acuta a 10 anni sono risultati essere rispettivamente inferiori al 10% e al 3% (46).

1.3.3 Eritrocitosi Secondarie Congenite

1.3.3.1 Difetti congeniti a carico dell'Oxygen-sensing Pathway

La corretta omeostasi dell'ossigeno e la risposta a situazioni di ipossia che possono portare a danni a cellule e tessuti, coinvolgono numerosi geni, facenti parte di quella che viene definita "Oxygen-sensing Pathway" (47). La risposta cellulare all'ipossia è controllata da una famiglia di fattori di trascrizione, noti come fattori indotti dall'ipossia (HIFs). HIF è composto da una sottounità HIF-1 β costitutivamente espressa e da una sottounità HIF- α ossigeno-regolata. Esistono 3 isoforme di HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α); la principale forma implicata nell'eritropoiesi è HIF-2 α .

In condizioni di normossia, HIF- α viene idrossilata su un residuo di prolina (Pro-OH) dalla prolin idrossilasi-dominio 2 (PHD2), che utilizza l'ossigeno e l' α -chetoglutarato come substrato. L'HIF- α idrossilato interagisce con la proteina Von Hippel-Lindau (VHL), sottounità di riconoscimento del substrato di un'ubiquitina ligasi E3; la poliubiquitinazione di HIF- α ne comporta la sua degradazione proteosomale. L'attività trascrizionale di *HIF* è regolata inoltre dal fattore di inibizione di HIF (FIH), un asparaginil-idrossilasi che utilizza anch'essa O₂ per idrossilare HIF- α su un residuo di asparagina (Asn-OH); l'HIF- α contenente Asn-OH non può essere legato dalla proteina coattivatrice p300, impedendo così ad HIF- α di attivare la trascrizione del gene. In condizioni di ipossia, le reazioni di idrossilazione Pro e Asn sono inibite e HIF- α si accumula, dimerizza con HIF- β , recluta p300, si lega agli elementi di risposta ipossica (HRE) e attiva la trascrizione da parte della RNA polimerasi di centinaia di geni target, incluso quello dell'EPO (5,47)

Questa pathway è schematizzata in Figura 2 (48).

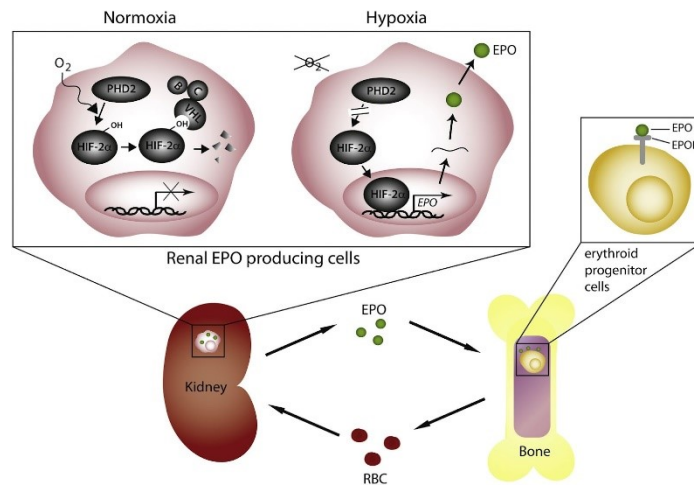


Figura 2: Oxygen-sensing Pathway

Mutazioni a carico dei geni implicati in tale complesso sistema di omeostasi possono essere responsabili di eritrocitosi.

Eritrocitosi congenita di tipo 2 (ECYT 2): mutazioni a carico del gene VHL

La prima forma descritta di eritrocitosi congenita secondaria a mutazioni a carico dell'OSP, fu la Policitemia di Chuvash, dalla Chuvashia, regione della Russia dove vennero identificati i primi casi. Tale forma è dovuta a mutazioni a carico del gene *VHL* (49).

Nello specifico, i pazienti affetti da tale forma di eritrocitosi presentano omozigosi per una mutazione puntiforme missenso C598T nel gene *VHL*, che porta alla sostituzione di Arg in Trp al residuo aminoacidico 200 (Arg200Trp, R200W) (49). Tale proteina mutata non è più in grado di combinarsi con HIF- α , che non viene quindi degradato dal proteasoma e può dimerizzare con HIF- β e attivare la trascrizione genica.

La Policitemia di Chuvash è quindi una rara forma di eritrocitosi secondaria congenita, a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata dal punto di vista clinico da eritrocitosi, incremento dei livelli sierici di EPO, rubor, vene varicose, ipotensione arteriosa, emangiomi vertebrali, ipertensione polmonare. Inoltre studi retrospettivi hanno evidenziato una maggiore associazione con trombosi arteriose e venose, eventi vascolari cerebrali e diminuita aspettativa di vita (50,51). A

differenza dei portatori di Sindrome di VHL, forma autosomica dominante con predisposizione familiare al cancro, i pazienti con Policitemia di Chuvash non hanno aumentato rischio di tumore in quanto le mutazioni relative a questa forma non interferiscono con la funzione anti tumorale della proteina VHL (47).

Ad oggi, sono state identificate almeno 20 mutazioni loss-of-function (missenso, non senso) a carico del gene *VHL* in pazienti con eritrocitosi congenita isolata ed elevati livelli di EPO, sia in omozigosi che in doppia eterozigosi (52).

Eritrocitosi congenita di tipo 3: mutazioni a carico del gene *EGLN1* (*PHD2*)

L'eritrocitosi congenita tipo 3 (ECYT3) è causata da mutazioni, a trasmissione autosomica dominante, a carico del gene *EGLN1* che determinano loss-of-function di PHD2.

Sono state descritte almeno 30 mutazioni (missenso, non senso, piccole delezioni, inserzioni), tutte nel dominio catalitico di PHD2, che interferiscono con la sua capacità di legare HIF-2 α (14). Clinicamente il fenotipo è variabile, tra i sintomi sono state segnalate complicanze microvascolari come cefalea, tinnito, artromialgie, tra le complicanze trombosi superficiali o in sedi atipiche, cisti renali o angiomi (53,54). Inoltre, è stata riportata un'associazione tra mutazioni germinali a carico di *EGLN1* e tumori neuroendocrini (paraganglioma, feocromocitoma), suggerendo una funzione di tale proteina come soppressore tumorale (47,55).

Eritrocitosi congenita di tipo 4: mutazioni a carico del gene *EPAS1* (*HIF-2 α*)

Ad oggi 12 mutazioni (missenso) a carico del gene *EPAS1* determinanti gain-of function di HIF-2 α sono responsabili dell'eritrocitosi congenita tipo 4, a trasmissione autosomica dominante (52). I pazienti affetti da tale forma di eritrocitosi sembrerebbero presentare una maggiore ricorrenza di eventi tromboembolici (5). Anche in questo caso, è stato riportato il ruolo di mutazioni di *EPAS1*, in genere somatiche ma in un caso anche germinale, in pazienti con associazione di eritrocitosi e tumori neuroendocrini (paraganglioma, feocromocitoma, somatostatiniomi) (55).

1.3.3.2 Altre eritrocitosi secondarie congenite

Eritrocitosi congenita di tipo 5: mutazioni a carico del gene di EPO

Questa forma di eritrocitosi è dovuta a una mutazione del gene dell'EPO stessa. Si tratta di una delezione di un singolo nucleotide con conseguente frame shift, a trasmissione autosomica dominante, risultante in una gain-of-function da abolizione della traduzione del mRNA principale e conseguente spinta alla produzione di EPO da parte di un promotore alternativo. L'aumentata produzione di EPO è la causa dell'aumentata sintesi eritrocitaria (6,56).

Emoglobine ad alta affinità

L'emoglobina trasporta quasi tutto l'ossigeno nel sangue, e la forma della curva di dissociazione emoglobina-ossigeno descrive la capacità dell'emoglobina di portare ossigeno ai tessuti (Figura 3) (47).

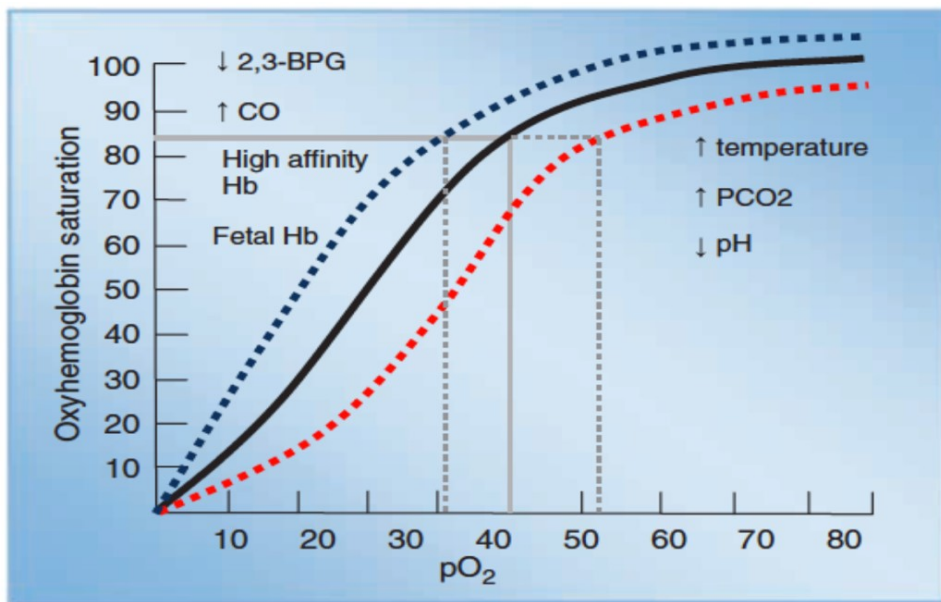


Figura 3: curva di dissociazione dell'emoglobina

Alcuni individui con eritrocitosi hanno una ridotta p50 (la pressione dell'ossigeno al 50% della saturazione della curva emoglobina-ossigeno). Questo può essere dovuto a un difetto nella struttura dell'emoglobina o a fattori esterni all'emoglobina. Nelle forme da difetto della struttura emoglobinica, le cosiddette emoglobine ad alta affinità, queste varianti non rilasciano ossigeno ai tessuti come l'emoglobina normale, inducendo uno stato di ipossia tissutale con conseguente incremento della produzione di EPO ed eritrocitosi (6,57).

La prima forma descritta di emoglobina ad alta affinità è stata riscontrata nel 1966 (13) in un uomo con eritrocitosi di 81 anni: l'analisi strutturale dell'emoglobina ha evidenziato un difetto nella catena alfa dell'emoglobina con sostituzione di Leucina in luogo di Arginina alla posizione 92, variante denominata Hb Chesapeake. Da quel momento sono stati descritti più di 100 difetti nei geni codificanti le catene alfa e beta dell'emoglobina, nei cromosomi 16 e 11 rispettivamente: le mutazioni sono ereditate come autosomiche dominanti e codificati come ECYT7; alcuni casi sporadici de novo sono stati riscontrati (58). Questi pazienti sono generalmente asintomatici e in alcuni casi mostrano sintomi da iperviscosità ed eventi tromboembolici dovuti ad elevato ematocrito (59).

Metemoglobinemia

La Metemoglobinemia è una rara condizione in cui il ferro contenuto nell'eme è nella sua forma ossidata, passando da ferroso a ferrico, con conseguente alterata cessione periferica di ossigeno.

La metemoglobinemia può essere acquisita o congenita. Le forme acquisite possono risultare da esposizione a sostanze che causano ossidazione di Hb sia direttamente che indirettamente. Le forme congenite sono di 3 tipi: autosomiche recessive da deficit del citocromo b5 reduttasi (gene *CYB5R3*) che converte il ferro da ferrico a ferroso, da deficit del citocromo b5 (gene *CYB5A*) e le forme autosomiche dominanti di Malattia da emoglobina M (gene *HBB*), in cui vi è una spontanea ossidazione del ferro emico.

Clinicamente la presenza di cianosi accompagnata a valori normali di PaO₂, ma bassa saturazione misurata al pulsiossimetro, pongono il sospetto di metaemoglobinemia (60).

Carenza di Bisfosfoglicerato Mutasi (BFGM)

Il 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BFG) è un fosfato organico che lega l'Hb, riducendone notevolmente l'affinità per l'O₂, determinando spostamento a destra della curva di dissociazione dell'Hb, permettendo un rilascio più efficiente di O₂ ai tessuti. L'enzima BFGM è responsabile della conversione dell'1,3-bisfosfoglicerato a 2,3-bisfosfoglicerato. I difetti congeniti di BFGM (ad oggi sono state descritte solo 4 mutazioni missenso, a trasmissione autosomica sia dominante che recessiva)(52,61) determinano carenza di 2,3-BFG con conseguente stabilizzazione dell'Hb nella configurazione ad alta affinità per l'O₂ e, pertanto, un minore rilascio di O₂ a livello dei tessuti, che viene compensato da un' aumentata produzione eritrocitaria (61).

1.3.4 Eritrocitosi secondarie acquisite

Numerose condizioni cliniche possono determinare eritrocitosi secondaria acquisita, associata ad un aumento fisiologico o patologico di EPO (5,17).

Ogni condizione che determina ridotta disponibilità di O₂, e quindi ipossia tissutale, può essere responsabile di incrementata produzione fisiologica di EPO e di conseguenza di eritrocitosi.

Tra le condizioni che possono causare eritrocitosi secondaria riconosciamo:

- ipossia centrale: malattie polmonari croniche (come la BPCO), altitudine, cardiopatie congenite cianogene, forte tabagismo, intossicazione da monossido di carbonio (6,55)
- ipossia locale a livello renale: idronefrosi, stenosi dell'arteria renale, rene policistico, insufficienza renale terminale ed eritrocitosi post-trapianto di rene (62,63)
- produzione ectopica di EPO: tumori maligni o benigni EPO-secerenti, inclusi emangioblastoma cerebellare, meningioma, adenoma/carcinoma paratiroideo, carcinoma epatocellulare, carcinoma a cellule renali, feocromocitoma e leiomioma uterino (55)
- farmaci/doping: somministrazione di EPO esogena o farmaci che inducono la produzione di EPO; somministrazione di androgeni (meccanismo

ipotizzato di soppressione dell'epidina da parte del testosterone con conseguente incremento della secrezione renale di EPO) (64,65).

Questi soggetti possono essere asintomatici, ed il riscontro di elevati livelli di GR essere casuale o in alcuni casi può manifestarsi sintomatologia da aumentata viscosità ematica come ad esempio mialgia, debolezza, fatigue, cefalea, visione offuscata, rallentamento psicomotorio (66).

In questi casi è importante individuare la condizione sottostante all'eritrocitosi perché curando questa si avrà conseguente risoluzione anche del quadro ematologico.

1.3.5 Eritrocitosi idiopatiche

1.3.5.1 Definizione ed epidemiologia

La diagnosi di Eritrocitosi Idiopatica viene formulata una volta escluse tutte le cause note di eritrocitosi primaria e secondaria.

Ad oggi l'EI rimane la forma più frequente di eritrocitosi (circa 70% dei casi), ad esclusione delle forme acquisite secondarie (Figura 4) (35).

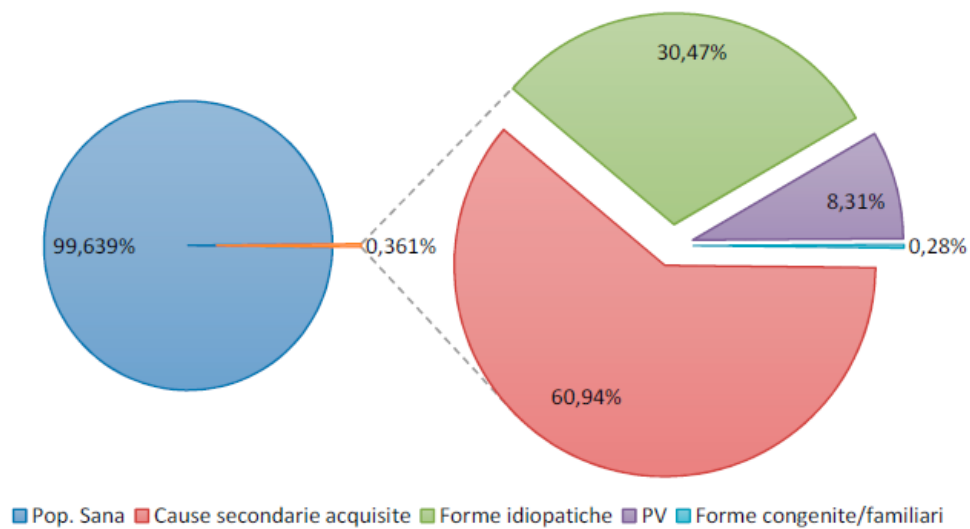


Figura 4: Prevalenza delle varie forme di eritrocitosi assoluta con distribuzione delle cause nella popolazione generale adulta

La prevalenza stimata è di circa 1.1 casi ogni 1000 persone, 4 volte più frequente della PV (35,67). L'età media alla diagnosi è di 52 anni, con una preponderanza di pazienti maschi.

Circa 1/3 dei pazienti con EI ha livelli di EPO al di sotto dei valori normali, suggerendo una causa primaria non identificata. I restanti 2/3 dei pazienti presentano invece livelli di EPO normali o elevati, suggerendo piuttosto una forma secondaria da causa non nota (5,17).

In passato la EI veniva definita anche “eritrocitosi benigna” (68), non solo per il decorso clinico generalmente indolente e non complicato da eventi trombotici, ma piuttosto dal fatto che, a differenza di quello dei pazienti con PV, non era

complicato da trasformazione ematologica maligna. Infatti, sono state pubblicate alcune serie di dati che riportavano un tasso di eventi trombotici comparabili con la PV (68), un'incidenza di complicanze cardiovascolari alla diagnosi pari al 46%, mentre un 17% dei pazienti morivano per incidenti cerebrovascolari (69). Studi più recenti evidenziano invece un rischio trombotico minore rispetto alla PV, ma comunque pari all'1% pazienti/anno (67,70); anche il rischio emorragico appare essere minore rispetto alla PV (70).

1.3.5.2 Eritrocitosi Idiopatiche e metabolismo del ferro

In quanto forma idiopatica, basata su una diagnosi di esclusione, l'esplorazione di nuove cause di eritrocitosi rappresenta una sfida nell'ambito della EI. Il metabolismo del ferro, essendo alla base dell'eritropoiesi, è sicuramente un ambito di ricerca interessante e che ha portato ad alcune osservazioni che si spera permettano di assottigliare il numero di forme di eritrocitosi che tutt'ora sono orfane di un meccanismo patogenetico.

Esistono diverse correlazioni tra le proteine implicate nel metabolismo del ferro e l'eritropoiesi. In corso di anemia come meccanismo compensatorio l'epcidina è soppressa, allo scopo di evitare la degradazione della ferroportina, necessaria per appaiare la fornitura di ferro alla domanda eritropoietica (71). Allo stesso tempo, l'anemia può essere determinata da elevati livelli di epcidina in corso di infiammazione come meccanismo di difesa, per ridurre la disponibilità di ferro per gli agenti infettanti (72). Tuttavia, mentre la relazione tra anemia e epcidina è stata ormai ben definita, sono stati pubblicati solo alcuni studi riguardanti la relazione tra aumentata biodisponibilità di ferro conseguente all'emocromatosi e aumentata eritropoiesi.

L'emocromatosi è uno dei più comuni disordini ematologici benigni che deriva da un eccessivo deposito di ferro a livello tissutale, specialmente nel fegato, pancreas e cuore (73).

Si distinguono innanzitutto due forme di emocromatosi: l'Emocromatosi primitiva o Ereditaria (HH), causata da mutazioni in diversi geni coinvolti nella regolazione del metabolismo del ferro che inducono aumento della ferritina sierica e abnorme accumulo di ferro nei tessuti dell'organismo (74) e l'Emocromatosi secondaria,

dovuta a diverse cause tra cui, eccessiva supplementazione parenterale o orale di ferro (ad es. da ripetute emotrasfusioni), anemie caratterizzate da eritropoiesi inefficace congenite (ad es. talassemia, anemia falciforme, anemia di Diamond-Blackfan, sferocitosi ereditaria) e acquisite (sindromi mielodisplastiche, mielofibrosi, anemia aplastica refrattaria), epatopatie croniche (epatiti, alcool, NASH, porfiria cutanea tarda), sindromi metaboliche (obesità, insulino-resistenza) e sovraccarico dietetico (siderosi dei Bantù) (75).

L'emocromatosi ereditaria è una malattia genetica eterogenea, di cui si distinguono 4 tipi sulla base del difetto genetico sottostante alla patologia (76):

- Tipo 1: è la forma più frequente, a trasmissione autosomica recessiva, dovuta a mutazioni di *HFE*. È caratterizzata da inappropriato aumento dell'assorbimento di ferro da parte della mucosa intestinale e ridotta espressione di epcidina da parte dell'epatocita. Le più frequenti mutazioni descritte a carico di *HFE* sono *HFEC282Y* e *HFEH63D* nel cromosoma 6. Le mutazioni di *HFEH63D* sono le più comuni, ma meno del 10% di questi pazienti presentano un fenotipo di emocromatosi (76).
- Tipo 2: a trasmissione autosomica recessiva, dipende nella maggior parte dei casi da mutazioni di hemojuvelin (gene *HJV*, tipo 2A) e, raramente, di epcidina (gene *HAMP*, tipo 2B) (77).
- Tipo 3: a trasmissione autosomica recessiva, è dovuta alla presenza di mutazioni del recettore della transferrina 2 (*TfR2*) (77).
- Tipo 4: a trasmissione autosomica dominante, è legata a mutazioni della ferroportina ("malattia da ferroportina") (77).

Nel 2016 è stato avviato uno studio volto ad approfondire una possibile relazione tra EI e alterazioni del metabolismo marziale: partendo dall'osservazione che alcuni pazienti affetti da EI presentavano ferritina alta alla diagnosi, senza che questo fosse correlato a cause secondarie di iperferritinemia, è stato ipotizzato che l'aumentata disponibilità di ferro risultante da difetti delle molecole coinvolte nel suo metabolismo potesse condurre all'incremento di eritropoiesi e successivamente quindi a eritrocitosi. In questo studio è stato dimostrato come l'incidenza delle mutazioni di *HFE* nei pazienti con EI fosse superiore a quella della popolazione

generale Europea (78) in modo statisticamente significativo. Tra i tipi di mutazioni riscontrate, la maggior parte erano eterozigosi per *HFEH63D* in accordo con la prevalenza generale Europea (79).

1.3.5.3. Clinica e terapia

I pazienti affetti da EI presentano caratteristiche emocromocitometriche di eritrocitosi con conta piastrinica e leucocitaria nella norma, assenza di splenomegalia e di rischio evolutivo in Mielofibrosi e Leucemia Acuta (67,80).

Da uno studio pubblicato nel 2015 è emerso che i livelli di EPO in questi pazienti erano per lo più in range o leggermente sopra il range, condizione che potrebbe evidenziare la presenza di una forma secondaria da causa non nota, mentre una minoranza di pazienti (circa 1:3) presentava EPO ridotta come da eritrocitosi primaria non identificata. Nei pazienti in cui è stata eseguita la biopsia osteomidollare non sono emerse alterazioni istologiche significative (80).

In uno studio retrospettivo del 2017 (70) condotto su un'ampia coorte di 145 pazienti con EI a confronto con altrettanti pazienti affetti da PV, sono state indagate le complicanze trombotiche ed emorragiche della EI. Ne è emerso che i pazienti con EI hanno un minor rischio di trombosi (1.5% pazienti/anno) rispetto a quelli con PV (3% pazienti/anno), forse a causa della normale conta di piastrine e globuli bianchi, sebbene superiore a quello della popolazione generale. Per quanto riguarda le emorragie, il tasso di incidenza nelle EI (0.57% pazienti/anno) è risultato circa 4 volte minore che nelle PV (2.9% pazienti/anno), non incrementato dall'uso di aspirina a basse dosi (70).

Pochi studi si sono concentrati sulle opzioni terapeutiche per le EI e pertanto non se ne conosce precisamente l'efficacia (67). La salassoterapia, cardine di trattamento nella PV (81), è raccomandata anche nell'eritrocitosi idiopatica, sebbene un target di ematocrito non sia stato univocamente stabilito. Nella EI, in caso di Ht maggiore del 54%, è raccomandata la salassoterapia con target di Ht al di sotto del 45%, anche se un target di Ht al di sotto del 50% risulta più praticabile (5); è invece raccomandata la salassoterapia anche in caso di Ht minore del 54% in

presenza di un concomitante aumento del rischio trombotico, come suggerito dalle presenza di segni di ischemia, precedente storia di eventi trombotici, arteriopatia periferica, ipertensione, diabete; in tal caso il target ideale di Ht sarebbe al di sotto del 45%. In questo gruppo di pazienti, la terapia citoriduttiva è invece controindicata (82).

Per quel che riguarda invece la terapia antiaggregante, a differenza della PV in cui è ben nota la riduzione del rischio trombotico grazie a terapia con aspirina a basso dosaggio (83), l'ASA non è mai stata testata in modo sistematico nella EI; in linea generale, essendo un agente antitrombotico la cui efficacia è provata in altre situazioni, sembra ragionevole ipotizzare che possa avere un effetto nel prevenire gli eventi tromboembolici in tutte le forme di eritrocitosi, e che quindi si debba considerare la somministrazione di ASA a basse dosi, in assenza di specifiche controindicazioni (5,55,84).

In conclusione, ad oggi la sola relativa conoscenza dell'eritrocitosi idiopatica e dell'impatto sulla clinica delle mutazioni ad oggi descritte, anche implicate nel metabolismo del ferro, in questo gruppo di pazienti non consente di dare indicazioni prognostiche a lungo termine né di fornire precise indicazioni terapeutiche e di prevenzione basate sull'evidenza.

CAPITOLO 2 - SCOPO DELLO STUDIO

In letteratura i dati disponibili riguardo la clinica, la diagnosi, la gestione terapeutica, il rischio di eventi trombotici ed emorragici dei pazienti con EI sono esigui. Il nostro studio ha preso in analisi un'ampia casistica di pazienti afferenti alla Clinica Medica I dell'Azienda Ospedaliera di Padova con diagnosi clinica di EI, studiati dal punto di vista genetico anche tramite le moderne tecniche di Next Generation Sequencing (NGS).

Di questi pazienti abbiamo raccolto i dati relativi allo stato mutazionale, la clinica, con particolare attenzione agli eventi trombo-emorragici e i relativi fattori di rischio, e l'eventuale atteggiamento terapeutico al fine di poter acquisire maggiori informazioni riguardo il trattamento e la prevenzione cardiovascolare e fornire delle indicazioni terapeutiche.

CAPITOLO 3 - PAZIENTI, MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

Il nostro centro ha creato da molti anni un database di patologia relativo alle trombocitosi ed eritrocitosi (“Registro osservazionale delle trombocitosi ed eritrocitosi”), allo scopo di raccogliere con modalità retrospettiva e prospettica, per finalità di ricerca, dati di pazienti, sia pediatrici che adulti, affetti da trombocitosi ed eritrocitosi di natura primitiva e/o secondaria, valutati in regime di ricovero, ricovero diurno, ambulatorio o consulenza presso le UOC di Clinica Medica 1 e di Oncoematologia pediatrica dell’Azienda Ospedaliera di Padova. Tale registro ha ricevuto l’approvazione da parte del Comitato Etico locale.

Per lo studio attuale abbiamo selezionato in modo retrospettivo 126 pazienti adulti, valutati presso il Nostro Centro dal 1998 ad oggi, affetti da eritrocitosi definita sulla base degli ultimi criteri WHO del 2016 per la PV (7): emoglobina > 165 g/L nell’uomo e > 160 g/L nella donna, e/o ematocrito > 49% nell’uomo e 48% nella donna.

Per tutti i pazienti inclusi nello studio è stata esclusa sia la diagnosi di Policitemia Vera (7) che tutte le possibili cause secondarie acquisite (malattie polmonari croniche, malattie cardiache cianogene, intossicazione da CO, alta quota, ecc..) con l’ausilio di una completa raccolta anamnestica ed un attento esame obiettivo, oltre alla misurazione della saturazione arteriosa di O₂, dosaggio di EPO, e, ove indicati, esecuzione di eventuali esami strumentali (Rx torace, Ecografia addome, test di funzionalità polmonare, ecc).

Le variabili raccolte per ogni paziente incluso nello studio sono:

- *Dati generali*: sesso, data di nascita, data della diagnosi/primo contatto, durata del follow-up;

- *Dati clinici*: presenza/assenza di eventi trombotici (arteriosi/venosi), sintomi a carico del microcircolo (cefalea, parestesie, vertigini, prurito acquagenico, eritromelalgia) o eventi emorragici (maggiori/minori) occorsi prima, al momento o dopo la diagnosi; Gli eventi trombotici maggiori sono stati divisi in arteriosi (stroke, attacco ischemico transitorio - TIA, infarto miocardico acuto - IMA, trombosi

arteriosa periferica, trombosi arteriosa splancnica) e venosi (trombosi venosa profonda - TVP, embolia polmonare - EP, trombosi venose in sedi inusuali - SVT). Le complicanze emorragiche sono state classificate in “maggiori” e “minori” in accordo con i criteri ISTH (85).

- *Fattori di rischio cardiovascolare*: ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, diabete, fumo.

- *Dati laboratoristici al momento della diagnosi*: esame emocromocitometrico (conta GB, Hb, Ht, conta piastrinica), dosaggio di EPO sierica, dosaggio della ferritina, per alcuni pazienti sono disponibili anche i valori di saturazione della transferrina.

- *Dati biomolecolari*: stato mutazionale dei geni correlati a eritrocitosi

-*Dati terapeutici relativi all'eritrocitosi*: salassoterapia, terapia antiaggregante, terapia anticoagulante. I pazienti sono stati sottoposti a salassoterapia per portare l'ematocrito al di sotto del 50% o ad un target inferiore quando indicato in base alle caratteristiche cliniche (presenza di fattori di rischio cardiovascolare e/o sintomi da iperviscosità e disturbi del microcircolo).

3.2 Analisi biomolecolari

I campioni per le analisi molecolari sono stati ottenuti da ogni paziente previo consenso informato scritto. Le analisi biomolecolari sono state eseguite su DNA estratto da granulociti usando EuroGold Blood DNA Mini Kit Plus (EuroClone).

Lo studio dei geni correlati ad eritrocitosi è stato condotto, nella maggior parte dei pazienti (118, 94%) con apposito pannello NGS comprendente geni coinvolti nell'emopoiesi e nel metabolismo del ferro (*ASXL1*, *EGLN1*, *EPAS1*, *HFE*, *JAK2*, *TFR2*, *VHL*, *EPOR*). Nei restanti 8 (6%) pazienti, lo studio è stato eseguito tramite sequenziamento con metodo Sanger e ha esplorato i geni di *EPOR*, dell'OSP (*VHL*, *EGLN1*, *EPAS1*) e *HFE*. Abbiamo dimostrato le seguenti frequenze di mutazioni (Tabella III).

Tabella III: numero di pazienti mutati (e mutazioni riscontrate) su pazienti non mutati per ogni gene studiato

Gene mutato	n° pazienti mutati/non mutati
ASXL1 (<i>ASXL1</i> Pro873Leu; <i>ASXL1</i> Glu1102Asp; <i>ASXL1</i> Thr1221Ile; <i>ASXL1</i> Lys1303Gln; <i>ASXL1</i> Gly704Arg; <i>ASXL1</i> Gly1397Ser)	9/108
EGLN1 (<i>EGLN1</i> Cys127Ser; <i>EGLN1</i> Gln157His; <i>EGLN1</i> Arg370Gly; <i>EGLN1</i> Ile269Thr)	18/108
EPAS1 (<i>EPAS1</i> Phe374Tyr; <i>EPAS1</i> Thr766Pro; <i>EPAS1</i> Arg550Trp)	6/120
HFE (<i>HFE</i> His63Asp; <i>HFE</i> Cys282Tyr; <i>HFE</i> Ser65Cys; <i>HFE</i> Glu277Lys)	53/72
JAK2 (<i>JAK2</i> Leu393Val; <i>JAK2</i> Gly48Glu; <i>JAK2</i> Leu113Val; <i>JAK2</i> Gly571Ser; <i>JAK2</i> Asn1108Ser; <i>JAK2</i> Thr78Ile; <i>JAK2</i> Arg923Cys)	9/109
TFR2 (<i>TFR2</i> Arg752His; <i>TFR2</i> Ala182Glu; <i>TFR2</i> Asp648Tyr; <i>TFR2</i> Asp602fs; <i>TFR2</i> Asp127Glu)	11/107
VHL (<i>VHL</i> Pro25Leu)	3/123
EPOR (<i>EPOR</i> Ala99Val; <i>EPOR</i> Asp398Glu; <i>EPOR</i> Glu181Asp; <i>EPOR</i> Asn487Ser; <i>EPOR</i> Gly46Glu)	8/118

3.3 Analisi statistiche

Le variabili dicotomiche ed ordinali sono state riportate come numero e percentuale. Le variabili continue sono state descritte come mediana e range (min-max). La differenza di distribuzione delle variabili nominali è stata valutata con il test del X² o il test esatto di Fisher ove indicato. La differenza nella distribuzione delle variabili continue è stata calcolata con il test U di Mann-Whitney. Le curve di sopravvivenza sono state preparate con il metodo di Kaplan-Meier, sono state calcolate dalla data della diagnosi fino all'evento o all'ultimo contatto/decesso e confrontate mediante il Log-Rank test.

L'analisi multivariata tempo dipendente dei fattori predittivi per trombosi è stata preparata con il modello di regressione di Cox. Un valore di p a due code < 0.05 è stato ritenuto statisticamente significativo. Tutte le analisi statistiche sono state ricavate utilizzando il pacchetto SPSS (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) soft v.28.

CAPITOLO 4 – RISULTATI

Le caratteristiche alla diagnosi/primo contatto, dei 126 pazienti oggetto dello studio sono riportate in Tabella IV.

Tabella IIIV: Mediana dei valori dei dati di laboratorio della coorte in studio

	n=126
Maschi, n (%)	108 (85.7%)
Mediana età alla diagnosi, anni	56.7 (20 – 85)
Mediana Hb, g/L	172 (160 – 196)
Mediana Ht, %	51 (48 – 58)
Mediana GR, x10¹²/L	5.6 (5.0 – 7.1)
Mediana GB, x10⁹/L	7.0 (3.6 – 18.5)
Mediana MCV, fl	89 (72 – 104)
Mediana Piastrine, x10⁹/L	211 (51 – 640)
Mediana EPO, UI	8 (3 – 38)
Mediana Ferritina, ug/L	185 (11 – 1421)
Mediana Saturazione della Transferrina, %	28.9 (5.6 – 49.0)
Pazienti con almeno una variante rilevata allo studio genetico, n (%)	80 (63.5%)

I pazienti della nostra coorte sono in prevalenza maschi (85.7%) di età mediana 56.7 anni (range 20-85 anni), con ematocrito ed emoglobina alla diagnosi rispettivamente superiori a 48% e 160 g/L, quindi corrispondenti ai valori usati per la diagnosi di eritrocitosi.

4.1 Analisi del rischio trombotico

In 97 pazienti (77% della casistica completa) abbiamo potuto ricostruire gli eventi trombotici e le scelte terapeutiche. In 57 di questi (58.8%) abbiamo raccolto anche i dati relativi ai fattori di rischio cardiovascolare.

Abbiamo osservato 17 eventi trombotici in 15 pazienti (15.5 %) dei 97 pazienti di cui erano disponibili i dati completi: 7 sindromi coronariche acute, 5 stroke, 5 Trombosi Venosa Profonda (TVP) di cui 3 complicate da embolia polmonare. In merito alla terapia per l'eritrocitosi (antitrombotica e/o salassoterapia): 13 (13.4%) non sono mai stati trattati, 70 (72.2%) hanno ricevuto almeno un trattamento per l'eritrocitosi, di questi, 16 (16.5%) sono stati sottoposti a soli salassi, 16 (16.5%) hanno usato antiaggreganti piastrinici, 30 (30.9%) entrambi e 3 (3.1%) erano in terapia anticoagulante. Tra i 15 pazienti che hanno avuto almeno un evento trombotico: 10 (66,7%) non erano in terapia al momento dell'evento, 5 (33,3%) hanno presentato la trombosi pur essendo in terapia (tutti erano in terapia antiaggregante, 2 facevano anche salassoterapia, 2 erano anche in anticoagulante).

Abbiamo confrontato le caratteristiche alla diagnosi dei pazienti che hanno avuto o meno un evento trombotico (Tabella V)

Tabella IV: Analisi dei valori studiati nei pazienti con/senza eventi trombotici

	Con eventi trombotici	Senza eventi trombotici	p
n° pazienti	15	82	-
Maschi, %	14 (93%)	69 (84%)	ns
Età alla diagnosi, anni	65 (51 – 83)	55 (20 – 85)	0.004
Hb, g/L	181 (166 – 190)	171 (160 - 196)	0.003
Ht, %	53 (48 – 56)	50 (48 - 58)	0.002
Mediana GR, x10¹²/L	5.7 (5.1 – 7.1)	5.6 (5.1 – 6.5)	ns
Mediana GB, x10⁹/L	8.7 (5.1 – 17.2)	6.9 (3.6 – 18.5)	0.009
Mediana Piastrine, x10⁹/L	215 (125 – 321)	210 (51 – 640)	ns
Mediana EPO, UI	11.3 (4.4 – 16.0)	8 (3 – 38)	ns
Mediana Ferritina, ug/L	300 (47 – 803)	185 (5 – 1421)	ns
Mediana Saturazione della Transferrina, %	23.6 (8.4 – 41.4)	29.0 (5.6 – 49.0)	ns
Pazienti mutati, n (%)	10 (66.7%)	51 (62.2%)	ns
Pazienti che presentano fattori di rischio CV, n (%)	6 (55%)	30 (65%)	ns

I pazienti che hanno avuto eventi trombotici sono risultati mediamente più vecchi al momento della diagnosi rispetto ai chi non ha fatto trombosi ($p = 0.004$, Figura 5a). Inoltre, avevano conta dei leucociti ($p = 0.009$, Figura 5d), emoglobina ($p = 0.003$, Figura 5b) ed ematocrito ($p = 0.002$, Figura 5c) più elevati alla diagnosi. Non sono emerse differenze statisticamente significative per gli altri parametri esplorati.

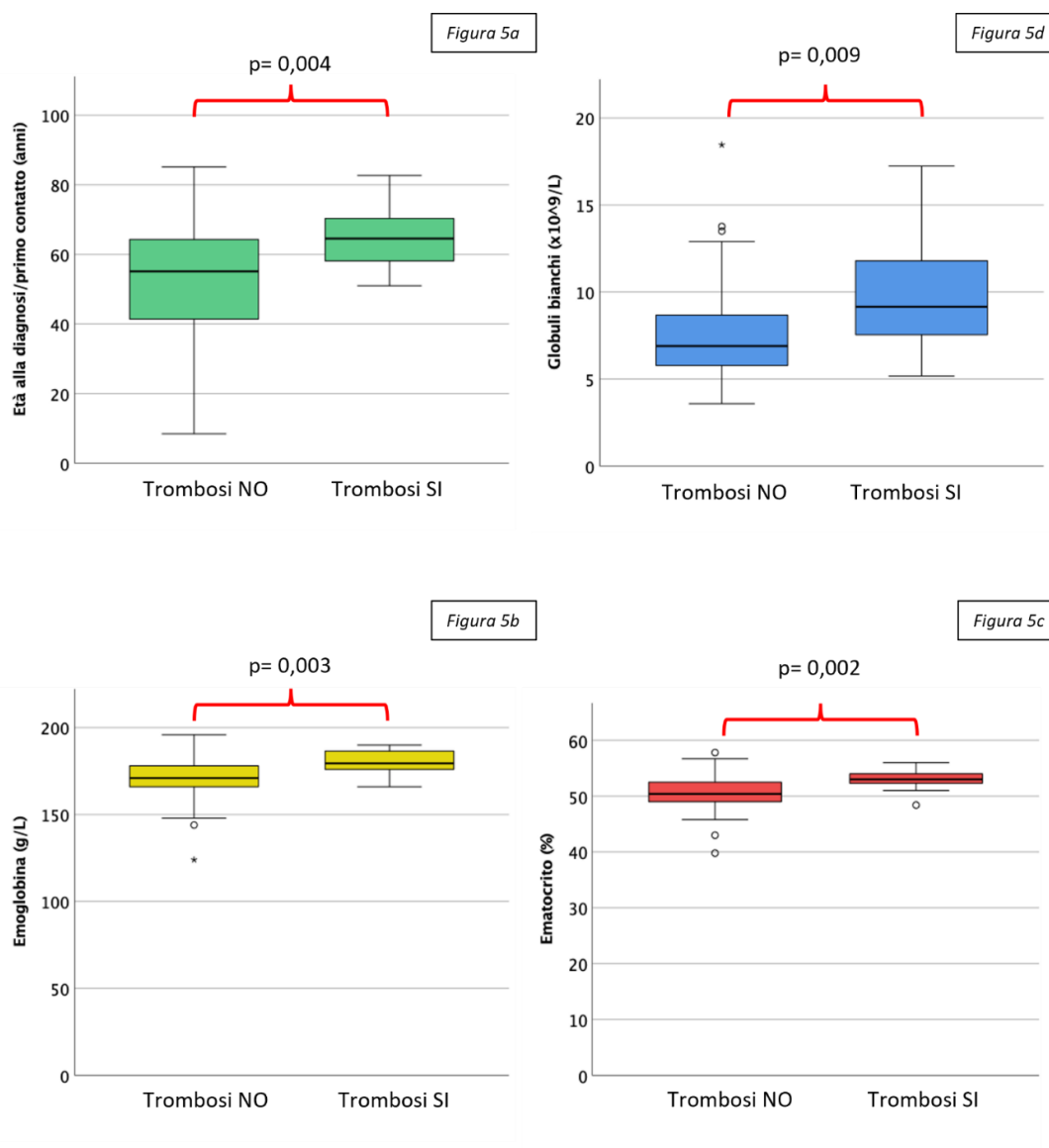


Figura 5: Confronto dei parametri alla diagnosi (a. Età; b. Hb; c. Ht; d. globuli bianchi) tra pazienti che hanno avuto o meno un evento trombotico.

Andando ad analizzare la sopravvivenza libera da eventi trombotici nei pazienti in cui avevamo dati clinico anamnestici e terapeutici completi ($n = 94$), non abbiamo osservato differenze tra maschi e femmine, pazienti mutati e non mutati, pazienti con o senza fattori di rischio CV.

La sopravvivenza libera da trombosi è risultata significativamente migliore ($p=0.04$) per i pazienti avviati a terapia antiaggregante in prevenzione primaria rispetto ai non trattati dalla diagnosi/primo contatto (Figura 6).

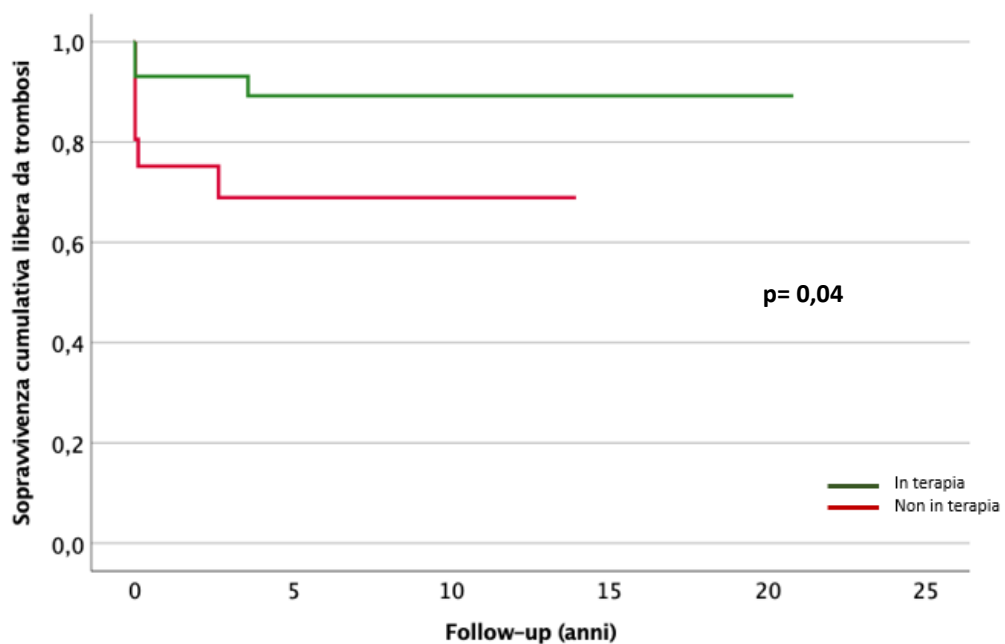


Figura 6: Curve di sopravvivenza libera da trombosi durante il follow-up dei pazienti affetti da EI trattati/non trattati con salassi o terapia antitrombotica

In analisi multivariata della sopravvivenza di Cox, corretta per sesso e presenza di fattori di rischio cardiovascolare, una maggiore età alla diagnosi/primo contatto ($p=0,013$) e la mancata istituzione di una terapia antiaggregante in prevenzione primaria ($p=0,03$) si sono confermati fattori di rischio indipendenti per trombosi.

4.1.1 Analisi della relazione tra stato mutazionale e rischio trombotico

Confrontando l'incidenza di eventi trombotici tra pazienti senza mutazioni e pazienti con almeno un gene mutato tra quelli esplorati non sono emerse differenze staticamente significative (Tabella V). Andando a valutare nel dettaglio lo stato mutazionale dei pazienti della nostra casistica con almeno una variante genetica rilevata e che hanno avuto almeno un evento trombotico ($n=10$), è emersa una frequenza elevata di pazienti con variante di *HFE*: 9 su 10 erano portatori di almeno una alterazione di *HFE* (7 con mutazioni solo a carico di *HFE*, in particolare 5 H63D omo- o eterozigote, 1 C282Y e 1 compound C282Y/H63D, e 2 con varianti di *HFE* associata a alterazioni su altri geni esplorati, in particolare 1 C282Y e mutazione a carico di *JAK2*, 1 S65C e alterazioni a carico di *EGNLI* e *VHL*).

Andando ad analizzare la sopravvivenza libera da trombosi dei pazienti con dati clinici completi e con almeno una alterazione a carico dei geni esplorati ($n = 62$), abbiamo dunque stratificato i pazienti in base allo stato mutazionale di *HFE* ed è emersa una sopravvivenza libera da trombosi significativamente peggiore per i pazienti portatori di almeno una variante di *HFE* rispetto ai portatori di mutazioni a carico di altri geni, non *HFE* ($p = 0,019$, Figura 7)

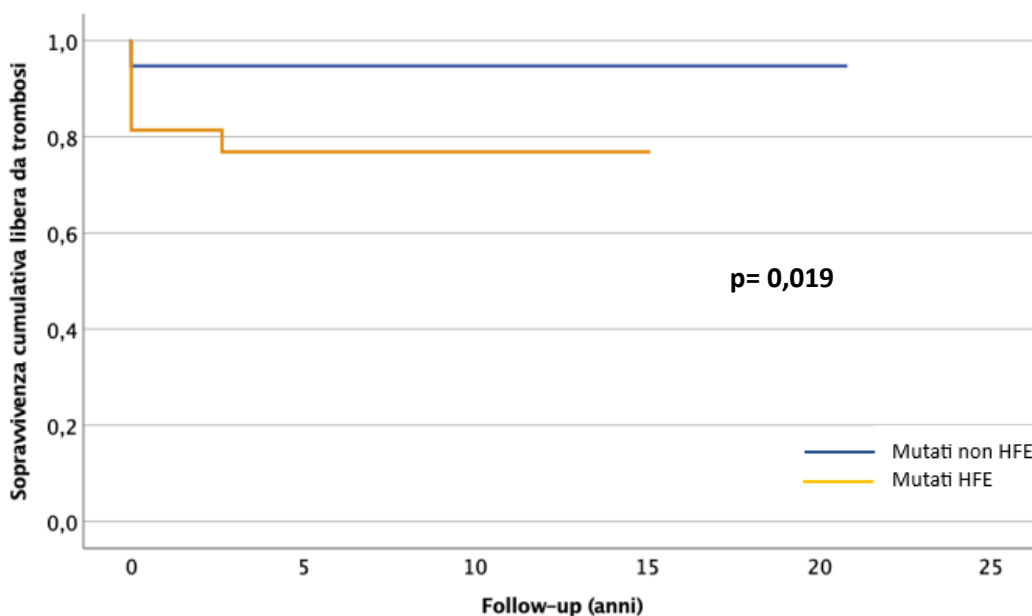


Figura 7: Curve di sopravvivenza libera da trombosi durante il follow-up dei pazienti affetti da EI mutati *HFE*/non *HFE*

4.2 Analisi del rischio emorragico

In merito alla diatesi emorragica, abbiamo potuto raccogliere i dati di 59 pazienti (46.8% della casistica generale) (Tabella VI). Abbiamo osservato 7 emorragie (2 maggiori, 5 minori) in 5 pazienti (8.5%): 2 emorragie cerebrali, 2 emorragie del tratto gastroenterico, 1 ematoma, 1 epistassi e 1 ematoma gluteo post-traumatico.

Tre dei 5 pazienti che hanno sanguinato erano in terapia antitrombotica (antiaggregante e/o anticoagulante) al momento dell'evento.

In considerazione del numero esigui di eventi emorragici osservati non è stato possibile eseguire l'analisi di sopravvivenza libera da emorragia.

Tabella VI: Analisi dei valori studiati nei pazienti con/senza eventi emorragici

	Con eventi emorragici	Senza eventi emorragici	p
n° pazienti	5	54	-
Maschi, %	5 (100%)	44 (81.5%)	ns
Età alla diagnosi, anni	64 (51 – 82)	60 (17 – 85)	ns
Hb, g/L	178 (166 – 185)	175 (160 – 196)	ns
Ht, %	52.5 (48.4 – 54.4)	51 (48 – 56.7)	ns
Mediana GR, x10¹²/L	5.6 (5.1 – 6.1)	5.6 (5.1 – 7.1)	ns
Mediana GB, x10⁹/L	7.6 (5.2 – 9.6)	7.4 (3.6 – 17.2)	ns
Mediana Piastrine, x10⁹/L	210 (100 – 321)	210 (124 – 640)	ns
Mediana EPO, UI	7.7 (4.4 – 16.0)	8.9 (3.0 – 38.0)	ns
Mediana Ferritina, ug/L	163.5 (28.0 – 174.0)	265.0 (11.0 – 746.0)	ns
Mediana Saturazione della Transferrina, %	33.5 (33.5 – 33.5)	30.2 (8.4 – 41.4)	ns
Pazienti mutati, n (%)	5 (100%)	29 (53.7%)	ns
Pazienti che presentano fattori di rischio CV, n (%)	2 (40%)	34 (63%)	ns

CAPITOLO 5 – DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

L'eritrocitosi idiopatica rappresenta la forma più diffusa di eritrocitosi, seconda solo alle forme secondarie acquisite (55), quattro volte più frequente della PV che ad oggi è la forma di eritrocitosi primitiva acquisita più studiata e per la quale sono state definite e recentemente aggiornate, linee guida precise per la diagnosi, la stratificazione del rischio, il management e il trattamento (86).

La diagnosi di EI viene formulata una volta escluse tutte le altre cause di eritrocitosi. Essendo dunque una diagnosi di esclusione, è una forma clinica eterogenea che potrebbe sottendere svariati meccanismi che inducono aumento della massa eritrocitaria come ad esempio varianti fisiologiche, eritrocitosi congenite non ancora note, eritrocitosi acquisite secondarie non riconosciute e forme di eritrocitosi primarie o secondarie ancora non descritte (87). A causa di ciò è difficile stabilirne la corretta gestione e formulare un approccio terapeutico comune. Ad oggi pochi studi si sono concentrati sulla definizione delle caratteristiche cliniche, prognostiche e degli outcomes della EI (5,55,67,70,80,84), inoltre, studi clinici volti a validare l'utilizzo di salassi o della terapia antiaggregante nella EI non sono mai stati condotti, pertanto, delle raccomandazioni in merito alla terapia basate sull'evidenza non sono formulabili, sebbene la terapia citoriduttiva non sembri indicata in questo setting di pazienti (88).

Coerentemente con quanto già evidenziato nel corso di precedenti studi di coorte in pazienti affetti da eritrocitosi idiopatica (70,80), nella nostra popolazione di EI si riscontra una netta preponderanza di individui di sesso maschile, con una mediana di età intorno ai 50 anni. Nei nostri pazienti, conta leucocitaria, eritrocitaria e piastrinica sono nella norma a fronte di un aumento di emoglobina ed ematocrito. L'EPO, così come la ferritina e la saturazione della transferrina, mediamente ricadono nei parametri di normalità, sebbene in casi isolati abbiamo osservato EPO ridotta o inappropriatamente oltre la norma, così come elevati livelli di ferritina, nello specifico in quest'ultimo caso, in concomitanza di mutazioni che insistono sul metabolismo del ferro.

È stato dimostrato che i pazienti con EI hanno un rischio di trombosi circa 1.5 volte superiore a quello della popolazione generale (70). Pur avendo registrato nella

nostra coorte un numero modesto di eventi trombotici, i nostri dati non si discostano da quanto avevamo osservato in precedenza. I pazienti che hanno presentato trombosi hanno età, emoglobina, ematocrito e conta leucocitaria più elevata alla diagnosi rispetto a coloro che non hanno avuto eventi vascolari e le trombosi arteriose sono state più comuni di quelle venose. Quest'ultima osservazione è coerente con quanto descritto in studi recenti che hanno suggerito come un ematocrito elevato possa promuovere di per sé la trombosi arteriosa a causa di un accelerato accumulo di piastrine all'interno del trombo, indipendentemente dalla generazione di trombina (89). Questo meccanismo potrebbe spiegare, dunque, la maggiore frequenza di trombosi arteriose rispetto alle venose nella EI.

Al momento, le uniche linee guida, peraltro con basso livello di evidenza, per il trattamento delle EI sono quelle inglesi (88) che suggeriscono salassi per ridurre la viscosità del sangue con l'obiettivo di raggiungere un ematocrito stabilmente inferiore al 55% e sotto il 45% nei pazienti con anamnesi di trombosi. Chiare indicazioni in merito all'appropriatezza di istituire una terapia antiaggregante, come per la PV (83), non sono state descritte, sebbene venga consigliato un approccio pragmatico guidato dalla clinica ed in particolare, l'eventuale presenza di fattori di rischio cardiovascolare che potrebbe indicare l'avvio di un trattamento con basse dosi di aspirina in prevenzione primaria o secondaria (88).

La maggior parte dei nostri pazienti è stata trattata con salassi per il mantenimento di un ematocrito attorno a 48-49%. Mancando delle evidenze chiare e specifiche per le EI, ci siamo ispirati alla terapia della PV, tollerando un livello di ematocrito un po' più elevato di quanto indicato per la malattia mieloproliferativa (90).

Circa la metà dei pazienti ha assunto, generalmente in aggiunta ai salassi, terapia con aspirina a basse dosi (100 mg/die) in prevenzione primaria. Abbiamo osservato come i pazienti trattati con terapia antiaggregante (in associazione o meno a salassoterapia) presentassero una sopravvivenza libera da trombosi, significativamente migliore rispetto a coloro che erano stati trattati solo con salassi o semplicemente monitorati nel tempo. Tale dato si è confermato anche in analisi multivariata corretta per sesso e per presenza di fattori di rischio cardiovascolare. Nell'insieme questa osservazione suggerisce un effetto protettivo della terapia

antiaggregante rispetto al rischio trombotico, così come è stato descritto in passato per la PV (83).

L'esiguo numero di eventi emorragici nella nostra casistica non ci ha permesso di valutare la sopravvivenza libera da emorragia. Nel semplice confronto dei parametri clinico-laboratoristici tra i pazienti che hanno sanguinato e coloro che non hanno avuto emorragie non sono emerse differenze significative, abbiamo però osservato che tre pazienti dei cinque con almeno un evento emorragico, erano già in terapia antitrombotica (antiaggregante e/o anticoagulante) al momento del sanguinamento. Questa osservazione impone di considerare attentamente il rapporto rischio/beneficio nel momento in cui si decide di proporre al paziente l'avvio di una terapia antiaggregante profilattica per la EI. Sebbene dal nostro studio emerga un effetto protettivo della terapia antiaggregante in prevenzione primaria sulla sopravvivenza libera da trombosi nei pazienti con EI, riteniamo che sia necessaria anche un'attenta valutazione del rischio emorragico, eventualmente con score dedicati (91) prima di avviare tale trattamento.

In passato, la terapia antiaggregante in profilassi primaria in presenza di fattori di rischio cardiovascolare era largamente utilizzata (92). Studi più recenti hanno messo in discussione tale approccio (93). Mentre nella PV l'utilizzo di aspirina a basso dosaggio è indicato in tutti i pazienti dal momento della diagnosi, indipendentemente dalla presenza o meno di fattori di rischio cardiovascolare (86), nella EI, che di fatto è una patologia più indolente e con un rischio trombotico inferiore, un approccio analogo potrebbe non essere indicato a fronte di un non trascurabile rischio emorragico. Una strategia potrebbe essere quella di valutare una terapia antiaggregante in prevenzione primaria solo nei pazienti con EI e presenza di fattori di rischio cardiovascolare. Tale ipotesi necessita di studi ulteriori e su coorti più numerose della nostra per essere eventualmente confermata.

Sappiamo dai dati in letteratura che in circa il 70% dei pazienti affetti da eritrocitosi non è possibile determinare una specifica eziologia. Grazie alle moderne metodiche di biologia molecolare, sequenziamento genico e di funzionalità proteica si è riusciti ad individuare in alcuni di questi pazienti alterazioni a livello dei geni coinvolti nell'Oxygen-sensing pathway e nel gene di EPOR, oltre ad alcune alterazioni meno frequenti che insistono su geni con un potenziale ruolo nell'omeostasi

dell'eritropoiesi (8). In recenti studi abbiamo dimostrato, inoltre, in un'alta percentuale di pazienti con EI, la presenza di varianti di *HFE* (79,94). Il sospetto è che vi sia una correlazione tra alterazioni delle proteine coinvolte nel metabolismo del ferro e l'aumento del numero di eritrociti ma un chiaro meccanismo non è stato ancora individuato. In particolare, non sono disponibili in questo momento dati sufficienti a determinare con certezza se le varianti di *HFE* siano un trigger sufficiente per l'aumento della massa eritrocitaria e lo sviluppo di eritrocitosi né se questo possa essere vincolato all'aumento della ferritina.

Varianti di geni coinvolti nel metabolismo marziale sono state riscontrate in un gran numero di pazienti della nostra coorte, sia coinvolgenti *TFR2*, ma soprattutto a carico di *HFE*. La variante di *HFE* più frequente riscontro della nostra casistica è H63D, presente in più della metà dei pazienti mutati, in accordo con i nostri studi precedenti (79,95). Le altre mutazioni riscontrate nel gene *HFE* sono la C282Y e più raramente la S65C e E277K, presenti nei pazienti con emocromatosi (95). La presenza preponderante della variante H63D tra i nostri pazienti potrebbe suggerire un ruolo di tale variante nel portare ad incremento dell'ematocrito, sebbene sia ritenuta solo un polimorfismo non determinante per il fenotipo clinico dell'emocromatosi. È comunque da sottolineare che in 17 casi l'alterazione di *HFE* era in associazione ad altre varianti dei geni studiati e pertanto il meccanismo patogenetico è ancor più complesso da ipotizzare.

Tra i parametri che abbiamo analizzato alla ricerca di fattori di rischio protrombotico, abbiamo fatto una sotto analisi dedicata allo stato mutazionale. È interessante notare come dal nostro studio emerga un dato finora mai descritto in letteratura, che pone in relazione la presenza di mutazioni di *HFE* con un aumentato rischio trombotico nei pazienti con EI. In particolare, tra i pazienti che hanno sofferto di un evento trombotico, molti portavano almeno una variante di *HFE*. Abbiamo estrapolato dalla coorte completa, solo i pazienti con almeno un gene mutato tra gli 8 studiati. Stratificando i casi secondo lo stato mutazionale rispetto ad *HFE* e confrontando quindi i pazienti con almeno una variante di *HFE* con quelli mutati per altri geni, abbiamo osservato che i pazienti con varianti di *HFE* avevano una sopravvivenza libera da trombosi significativamente inferiore rispetto coloro che portavano altre mutazioni. Non è ad oggi noto se le varianti di *HFE* siano associate ad un incremento del rischio trombotico di per sé. In letteratura è presente

un unico studio che sembra escludere la presenza di una correlazione tra la mutazione *HFEC282Y* e l'aumentato rischio di sviluppare stroke (124).

L'ipotesi che la combinazione tra eritrocitosi e mutazione di *HFE* dia un aumentato rischio di sviluppare eventi trombotici necessita di studi ulteriori e su coorti più numerose della nostra per essere eventualmente confermata.

In conclusione, i risultati del nostro studio confermano quanto abbiamo osservato in precedenza, ovvero che in più della metà dei pazienti con EI è possibile identificare una alterazione a carico di geni coinvolti nei meccanismi dell'eritropoiesi e nel metabolismo de ferro. Ciò che emerge di nuovo è la presenza di una possibile correlazione tra rischio trombotico e presenza di varianti di *HFE* anche se non è ancora chiaro il meccanismo con cui tali mutazioni possano determinare un aumento del rischio trombotico nei pazienti con EI.

La corretta gestione terapeutica della EI ad oggi non è ben definita e chiare indicazioni sull'impiego della salassoterapia e della terapia antiaggregante non sono state stabilite. Nel nostro studio la presenza di fattori di rischio cardiovascolare sembra non essere determinante nell'aumentato rischio trombotico dei pazienti con EI rispetto alla popolazione generale, mentre l'utilizzo di una profilassi antiaggregante sembra avere un effetto protettivo in tal senso a fronte di un ematocrito che si mantiene al di sotto del 50% eventualmente tramite salassoterapia. L'impressione è dunque che la terapia con basse dosi di aspirina rappresenti di per sé un trattamento che riduce il rischio trombotico nei pazienti con EI. Tale osservazione, sebbene interessante, non rappresenta però una solida indicazione ad avviare un trattamento antiaggregante in tutti i pazienti con EI al momento della diagnosi. L'inizio di un trattamento con aspirina a basso dosaggio va valutato attentamente tenendo in considerazione l'eventuale coesistenza di fattori di rischio cardiovascolare che potrebbe corroborare tale scelta, piuttosto che la presenza di un non trascurabile rischio emorragico che potrebbe controindicarla.

L'insieme delle nostre osservazioni pone le basi per studi su casistiche più ampie, necessari per arrivare ad una migliore definizione dell'iter diagnostico e ad una corretta gestione terapeutica, con indicazioni più precise e personalizzate, dei pazienti con eritrocitosi idiopatica.

BIBLIOGRAFIA

1. Bento C, Cario H, Gardie B, Hermouet S, McMullin MF. Congenital Erythrocytosis and Hereditary Thrombocytosis. 2015;
2. Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 2013 Jan;27(1):41–53.
3. Pearson TC, Guthrie DL, Simpson J, Chinn S, Barosi G, Ferrant A, et al. Interpretation of measured red cell mass and plasma volume in adults: Expert Panel on Radionuclides of the International Council for Standardization in Haematology. *Br J Haematol.* 1995;89(4):748–56.
4. Johansson PL, Safai-Kutti S, Kutti J. An elevated venous haemoglobin concentration cannot be used as a surrogate marker for absolute erythrocytosis: a study of patients with polycythaemia vera and apparent polycythaemia. *Br J Haematol.* 2005 Jun;129(5):701–5.
5. McMullin MF. Idiopathic erythrocytosis: a disappearing entity. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2009;629–35.
6. McMullin MF. Genetic Background of Congenital Erythrocytosis. *Genes.* 2021 Aug;12(8):1151.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016 May 19;127(20):2391–405.

8. Gangat N, Szuber N, Pardanani A, Tefferi A. JAK2 unmutated erythrocytosis: current diagnostic approach and therapeutic views. *Leukemia*. 2021 Aug;35(8):2166–81.
9. Jourdanet D. De l'anemie des altitudes et de l'anemie en general dans ses rapports avec la pression de l'athmosphere. 1863;Bailliere (Paris).
10. West JB, Richalet JP. Denis Jourdanet (1815–1892) and the early recognition of the role of hypoxia at high altitude. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 2013 Sep;305(5):L333–40.
11. P C. Sur l'activite hemopoietique du serum au cours de la regeneration du sang. *C R Acad Sci*. 1906;143:384–6.
12. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*. 2008 Jan;22(1):3–13.
13. S C, Dj W, Jb C. Polycythemia associated with a hemoglobinopathy. *J Clin Invest*. 1966 Jun 1;45:813–22.
14. Bento C, Percy MJ, Gardie B, Maia TM, van Wijk R, Perrotta S, et al. Genetic Basis of Congenital Erythrocytosis: Mutation Update and Online Databases. *Hum Mutat*. 2014;35(1):15–26.
15. Mithoowani S, Laureano M, Crowther MA, Hillis CM. Investigation and management of erythrocytosis. *CMAJ Can Med Assoc J*. 2020 Aug 10;192(32):E913–8.
16. Blacklock HA, Royle GA. Idiopathic erythrocytosis--a declining entity. *Br J Haematol*. 2001 Dec;115(4):774–81.

17. McMULLIN MF. The classification and diagnosis of erythrocytosis. *Int J Lab Hematol.* 2008;30(6):447–59.
18. Huang L, Shen YM, Bulut GB. Advances in understanding the pathogenesis of primary familial and congenital polycythemia - PMC. *Br J Haematol.* 2010; 148(6): 844-52.
19. Arcasoy MO, Degar BA, Harris KW, Forget BG. Familial erythrocytosis associated with a short deletion in the erythropoietin receptor gene. *Blood.* 1997 Jun 15;89(12):4628–35.
20. Percy MJ, McMullin MF, Roques AW, Westwood NB, Acharya J, Hughes AE, et al. Erythrocytosis due to a mutation in the erythropoietin receptor gene. *Br J Haematol.* 1998 Feb;100(2):407–10.
21. Prchal JT, Semenza GL, Prchal J, Sokol L. Familial polycythemia. *Science.* 1995 Jun 30;268(5219):1831–2.
22. McMullin MF. Congenital erythrocytosis. *Int J Lab Hematol.* 2016;38(S1):59–65.
23. Oh ST, Zahn JM, Jones CD, Zhang B, Loh ML, Kantarjian H, et al. Identification of Novel LNK Mutations In Patients with Chronic Myeloproliferative Neoplasms and Related Disorders. *Blood.* 2010 Nov 19;116(21):315.
24. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signalling pathways. *Blood* 2005;105:4604–11

25. Regimbeau M, Mary R, Hermetet F, Girodon F. Genetic Background of Polycythemia Vera. *Genes*. 2022 Apr 2;13(4):637.
26. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet Lond Engl*. 2005 Mar 19;365(9464):1054–61.
27. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):387–97.
28. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779–90.
29. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144–8.
30. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):22788–92.
31. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007 Feb 1;356(5):459–68.

32. McNally RJ, Rowland D, Roman E, Cartwright RA. Age and sex distributions of hematological malignancies in the U.K. *Hematol Oncol*. 1997 Nov;15(4):173–89.
33. Barbui T. How to manage children and young adults with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2012 Jul;26(7):1452–7.
34. Kutti J, Ridell B. Epidemiology of the myeloproliferative disorders: essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Pathol Biol (Paris)*. 2001 Mar;49(2):164–6.
35. Ruggeri M, Tosetto A, Frezzato M, Rodeghiero F. The rate of progression to polycythemia vera or essential thrombocythemia in patients with erythrocytosis or thrombocytosis. *Ann Intern Med*. 2003 Sep 16;139(6):470–5.
36. Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4272–90.
37. Tefferi A, Barbui T. Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera: Focus on Clinical Practice. *Mayo Clin Proc*. 2015 Sep;90(9):1283–93.
38. Geyer H, Mesa RA. Assessing disease burden in patients with classic MPNs. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014 Jun 1;27(2):107–19.
39. Siegel FP, Tauscher J, Petrides PE. Aquagenic pruritus in polycythemia vera: characteristics and influence on quality of life in 441 patients. *Am J Hematol*. 2013 Aug;88(8):665–9.
40. Hellmann A. Myeloproliferative syndromes: diagnosis and therapeutic options. *Pol Arch Med Wewn*. 2008 Dec;118(12):756–60.

41. Spivak J. Daily aspirin--only half the answer. *N Engl J Med*. 2004 Jan 8;350(2):99–101.
42. Stein BL, Saraf S, Sobol U, Halpern A, Shammo J, Rondelli D, et al. Age-related differences in disease characteristics and clinical outcomes in polycythemia vera. *Leuk Lymphoma*. 2013 Sep 1;54(9):1989–95.
43. Sekhar M, McVinnie K, Burroughs AK. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol*. 2013 Sep;162(6):730–47.
44. Cervantes F, Passamonti F, Barosi G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2008 May;22(5):905–14.
45. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med*. 2004 Nov 15;117(10):755–61.
46. Crisà E, Venturino E, Passera R, Prina M, Schinco P, Borchiellini A, et al. A retrospective study on 226 polycythemia vera patients: impact of median hematocrit value on clinical outcomes and survival improvement with anti-thrombotic prophylaxis and non-alkylating drugs. *Ann Hematol*. 2010 Jul;89(7):691–9.
47. Patnaik MM, Tefferi A. The complete evaluation of erythrocytosis: congenital and acquired. *Leukemia*. 2009 May;23(5):834–44.

48. Lappin TR, Lee FS. Update on mutations in the HIF: EPO pathway and their role in erythrocytosis. *Blood Rev.* 2019 Sep 1;37:100590.
49. Ang SO, Chen H, Gordeuk VR, Sergueeva AI, Polyakova LA, Miasnikova GY, et al. Endemic polycythemia in Russia: mutation in the VHL gene. *Blood Cells Mol Dis.* 2002;28(1):57–62.
50. Gordeuk VR, Sergueeva AI, Miasnikova GY, Okhotin D, Voloshin Y, Choyke PL, et al. Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. *Blood.* 2004 May 15;103(10):3924–32.
51. Gordeuk VR, Prchal JT. Vascular complications in Chuvash polycythemia. *Semin Thromb Hemost.* 2006 Apr;32(3):289–94.
52. Bento C. Genetic basis of congenital erythrocytosis. *Int J Lab Hematol.* 2018 May;40 Suppl 1:62–7.
53. Wilson R, Syed N, Shah P. Erythrocytosis due to PHD2 Mutations: A Review of Clinical Presentation, Diagnosis, and Genetics. *Case Rep Hematol.* 2016;2016:6373706.
54. Percy MJ, Furlow PW, Beer PA, Lappin TRJ, McMullin MF, Lee FS. A novel erythrocytosis-associated PHD2 mutation suggests the location of a HIF binding groove. *Blood.* 2007 Sep 15;110(6):2193–6.
55. McMullin MF. Investigation and Management of Erythrocytosis. *Curr Hematol Malig Rep.* 2016 Oct;11(5):342–7.

56. Zmajkovic, J.; Lundberg, P.; Nienhold, R.; Torgersen, M.L.; Sundan, A.; Waage, A.; Skoda, R.C. A Gain-of-Function Mutation in EPO in Familial Erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2018, 378, 924–930.
57. Esparcieux A, Francina A, Vital-Durand D. [Abnormal hemoglobins with high oxygen affinity in the differential diagnosis of polycythemia]. *Rev Med Interne.* 2011 Oct;32(10):e105-107.
58. Percy MJ, Butt NN, Crotty GM, Drummond MW, Harrison C, Jones GL, et al. Identification of high oxygen affinity hemoglobin variants in the investigation of patients with erythrocytosis. *Haematologica.* 2009 Sep;94(9):1321–2.
59. Weatherall DJ, Clegg JB, Callender ST, Wells RM, Gale RE, Huehns ER, et al. Haemoglobin Radcliffe ($\alpha_2\beta_299(\text{Gi})\text{Ala}$): a high oxygen-affinity variant causing familial polycythaemia. *Br J Haematol.* 1977 Feb;35(2):177–91.
60. Iolascon A, Bianchi P, Andolfo I, Russo R, Barcellini W, Fermo E, et al. Recommendations for diagnosis and treatment of methemoglobinemia. *Am J Hematol.* 2021 Dec;96(12):1666–78.
61. Benesch RE, Benesch R, Yu CI. The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration. *Biochemistry.* 1969 Jun;8(6):2567–71.
62. Shih LY, Leu ML. Erythrocytosis in patients with renal failure on hemodialysis: study of underlying mechanism by in vitro erythroid culture assay. *Exp Hematol.* 1993 Aug;21(9):1239–43.

63. Chandra M, Miller ME, Garcia JF, Mossey RT, McVicar M. Serum immunoreactive erythropoietin levels in patients with polycystic kidney disease as compared with other hemodialysis patients. *Nephron*. 1985;39(1):26–9.
64. Mørkeberg J. Blood manipulation: current challenges from an anti-doping perspective. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:627–31.
65. Guo W, Bachman E, Li M, Roy CN, Blusztajn J, Wong S, et al. Testosterone Administration Inhibits Hpcidin Transcription and is Associated with Increased Iron Incorporation into Red Blood Cells. *Aging Cell*. 2013 Apr;12(2):280–91.
66. McMullin MF. Secondary erythrocytosis. *Hematology*. 2014 Apr 1;19(3):183–4.
67. Finazzi G, Gregg XT, Barbui T, Prchal JT. Idiopathic erythrocytosis and other non-clonal polycythemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(3):471–82.
68. Modan B, Modan M. Benign erythrocytosis. *Br J Haematol*. 1968 Apr;14(4):375–81.
69. Pearson TC, Wetherley-Mein G. Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. *Lancet Lond Engl*. 1978 Dec 9;2(8102):1219–22.
70. Bertozzi I, Ruggeri M, Nichele I, Biagetti G, Cosi E, Randi ML. Thrombotic and hemorrhagic complications in idiopathic erythrocytosis. *Am J Hematol*. 2017;92(11):E639–41.

71. Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3730–5.
72. Wang CY, Babitt JL. Hepcidin regulation in the anemia of inflammation. *Curr Opin Hematol*. 2016 May;23(3):189–97.
73. Yun S, Vincelette ND. Update on iron metabolism and molecular perspective of common genetic and acquired disorder, hemochromatosis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015 Jul;95(1):12–25.
74. Pietrangelo A. Hemochromatosis: an endocrine liver disease. *Hepatology* Baltim Md. 2007 Oct;46(4):1291–301.
75. Gattermann N. The Treatment of Secondary Hemochromatosis. *Dtsch Ärztebl Int*. 2009 Jul;106(30):499–504.
76. Adams PC, Reboussin DM, Barton JC, McLaren CE, Eckfeldt JH, McLaren GD, et al. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1769–78.
77. Kowdley KV, Brown KE, Ahn J, Sundaram V. ACG Clinical Guideline: Hereditary Hemochromatosis. *Am J Gastroenterol*. 2019 Aug;114(8):1202–18.
78. Merryweather-Clarke AT, Pointon JJ, Shearman JD, Robson KJ. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet*. 1997 Apr;34(4):275–8.

79. Biagetti G, Catherwood M, Robson N, Bertozzi I, Cosi E, McMullin MF, et al. HFE mutations in idiopathic erythrocytosis. *Br J Haematol.* 2018 Apr;181(2):270–2.
80. Randi ML, Bertozzi I, Cosi E, Santarossa C, Peroni E, Fabris F. Idiopathic erythrocytosis: a study of a large cohort with a long follow-up. *Ann Hematol.* 2016 Jan;95(2):233–7.
81. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, et al. Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera. *N Engl J Med.* 2013 Jan 3;368(1):22–33.
82. McMullin MF, Bareford D, Campbell P, Green AR, Harrison C, Hunt B, et al. Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis. *Br J Haematol.* 2005;130(2):174–95.
83. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, et al. Vascular and Neoplastic Risk in a Large Cohort of Patients With Polycythemia Vera. *J Clin Oncol.* 2005 Apr;23(10):2224–32.
84. McMullin MF. Diagnosis and management of congenital and idiopathic erythrocytosis. *Ther Adv Hematol.* 2012 Dec;3(6):391–8.
85. Schulman S, Kearon C, Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. *J Thromb Haemost JTH.* 2005 Apr;3(4):692–4.

86. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020 Dec;95(12):1599–613.
87. Pearson TC, Messinezy M. Idiopathic erythrocytosis, diagnosis and clinical management. *Pathol Biol (Paris)*. 2001 Mar;49(2):170–7.
88. McMullin MFF, Mead AJ, Ali S, Cargo C, Chen F, Ewing J, et al. A guideline for the management of specific situations in polycythaemia vera and secondary erythrocytosis. *Br J Haematol*. 2019 Jan;184(2):161–75.
89. Walton BL, Lehmann M, Skorzewski T, Holle LA, Beckman JD, Cribb JA, et al. Elevated hematocrit enhances platelet accumulation following vascular injury. *Blood*. 2017 May 1;129(18):2537–46.
90. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2004 Jan 8;350(2):114–24.
91. Pisters R, Lane DA, Nieuwlaat R, de Vos CB, Crijns HJGM, Lip GYH. A novel user-friendly score (HAS-BLED) to assess 1-year risk of major bleeding in patients with atrial fibrillation: the Euro Heart Survey. *Chest*. 2010 Nov;138(5):1093–100.
92. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002 Jan 12;324(7329):71–86.

93. Berger JS. Aspirin for Primary Prevention—Time to Rethink Our Approach. *JAMA Netw Open*. 2022 Apr 26;5(4):e2210144–e2210144.
94. Burlet B, Bourgeois V, Buriller C, Aral B, Airaud F, Garrec C, et al. High HFE mutation incidence in idiopathic erythrocytosis. *Br J Haematol*. 2019 May;185(4):794–5.
95. Gurnari C, Lombardi AM, Cosi E, Biagetti G, Buccisano F, Franceschini L, et al. Genetic analysis of erythrocytosis reveals possible causative and modifier gene mutations. *Br J Haematol*. 2019;186(4):e100–3.