



Università degli Studi di Cagliari

## **DOTTORATO DI RICERCA**

Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo

Ciclo XXIII

### **TITOLO TESI**

Efficacia e sicurezza della terapia ferrochelante combinata in pazienti con  
talassemia major e grave sovraccarico di ferro intracardiaco

Settore scientifico disciplinare di afferenza

MED/38

Presentata da: D.ssa Simona Campus

Coordinatore Dottorato: Prof. Renzo Galanello

Tutor: Prof. Renzo Galanello

Esame finale anno accademico 2009 - 2010



## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
Generalità .....	1
La terapia ferro-chelante .....	4
La desferrioxamina .....	5
La cardiopatia nel paziente talassemico.....	7
Recenti progressi.....	13
Nuovi farmaci ferro-chelanti.....	13
T2* cardiaco.....	15
La cardiopatia nel paziente talassemico oggi.....	20
<b>SCOPO DEL LAVORO</b> .....	<b>23</b>
<b>PAZIENTI</b> .....	<b>24</b>
<b>METODI</b> .....	<b>26</b>
<b>RISULTATI</b> .....	<b>27</b>
Variazioni per indici.....	28
T2* cardiaco.....	28
R2 cardiaco .....	29
Frazione di Eiezione (FE) .....	31
T2* epatico.....	32
Ferritina.....	33
Confronto tra gruppi di compliance .....	34
Delta T2* cardiaco (mesi).....	34
Delta R2 (mesi) .....	36
Delta FE (mesi) .....	37
Delta T2*epatico (mesi).....	38
Delta ferritina (mesi).....	39
Effetti collaterali.....	40
Sopravvivenza .....	40
<b>DISCUSSIONE</b> .....	<b>41</b>
<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>48</b>

# INTRODUZIONE

## Generalità

La beta-talassemia rappresenta una delle malattie genetiche più comune al mondo con 94 milioni di eterozigoti e 60 mila omozigoti nati ogni anno<sup>1</sup>. Le mutazioni nel gene che codifica per le catene beta-globiniche dell'emoglobina sono responsabili della deficitaria produzione di emoglobina adulta (HbA) con distruzione intramidollare e conseguente eritropoiesi inefficace. I sintomi clinici iniziano a comparire ad un'età compresa tra i 6 e i 24 mesi. L'anemia grave che ne deriva rende necessario il precoce ricorso ad un regime trasfusionale a vita che consente la sopravvivenza.

Il trattamento raccomandato per pazienti affetti da talassemia major<sup>2</sup> prevede quindi trasfusioni di emazie concentrate ogni 2-3 settimane con frequenza variabile da paziente a paziente, al fine di mantenere i valori di emoglobina pre-trasfusionale pari a  $9.5 \pm 0.4$  g/dl. L'emoglobina post-trasfusionale non dovrebbe invece superare i 15g/dl. Lo schema trasfusionale suggerito, in genere determina un consumo di sangue pari a 100-200 ml/kg/anno che equivale ad un accumulo di 0.3-0.6mg/Kg di ferro al giorno<sup>3</sup>.

E' proprio dal catabolismo del sangue trasfuso che dipende il grave sovraccarico marziale e le numerose complicanze ad esso legate.

Il nostro organismo non possiede, infatti, mezzi efficaci che impediscano l'accumulo del ferro in eccesso o ne garantiscano la sua eliminazione (Fig 1).



La tossicità del ferro, in particolare quello non legato a proteine di deposito o di trasporto (ferritina, emosiderina, transferrina), è dovuta al fatto che esso catalizza reazioni di ossidoriduzione che portano alla formazione di radicali liberi.

L'acqua ossigenata può infatti, secondo la nota reazione di Fenton, reagire con il  $\text{Fe}^{2+}$  e produrre l'idrossi radicale ( $\text{OH}\cdot$ ) e lo ione idrossilico ( $\text{OH}^-$ ):



L'*idrossi radicale* è estremamente ossidante ed è in grado di innescare reazioni libere a catena in quanto reagisce immediatamente con qualsiasi molecola biologica posta nelle vicinanze. Può effettuare reazioni di addizione a doppi legami, come quelli presenti nelle strutture aromatiche di purine e pirimidine che troviamo a livello di RNA e DNA causando mutazioni, rottura della doppia elica e infine cancerogenesi.

I radicali secondari che vengono prodotti, possono inoltre diffondere dal sito di origine determinando danni a distanza.

Lo *ione idrossilico* invece danneggia le membrane biologiche (mitocondri, lisosomi e membrana sarcoplasmatica) causando il processo autocatalitico di perossidazione lipidica.

Anche se l'organismo mette in atto una serie di meccanismi antiossidanti, questi non sono tuttavia in grado di annullare il danno ossidativo.

La terapia ferro-chelante come complemento al regime trasfusionale è dunque l'unica arma a disposizione per limitare i danni indotti dall'accumulo di ferro.

## La terapia ferro-chelante

L'introduzione dei chelanti del ferro intorno agli anni '70 ha modificato l'evoluzione naturale della malattia<sup>6</sup>. Queste molecole in virtù dell'elevata affinità per il ferro ionizzato ( $\text{Fe}^{3+}$ ) sono in grado di indurre la sua eliminazione consentendo il raggiungimento di concentrazioni più sicure. Sfortunatamente questo processo avviene molto lentamente perché solo una piccola quantità del ferro corporeo è disponibile per essere chelato giornalmente. Ciò significa che quando il chelante viene somministrato, soltanto una piccola quota è in grado di legare il ferro prima di essere escreto o metabolizzato.

Se un paziente è già in una condizione di sovraccarico marziale, anche instaurando un trattamento chelante intensivo possono essere necessari mesi o anni per ridurre il ferro corporeo a livelli di sicurezza. Incrementando la quantità del farmaco somministrato per accelerare la rimozione del ferro, si rischierebbe di aumentarne gli effetti tossici venendo sequestrato anche quello necessario per il normale metabolismo tissutale.

Un chelante ideale del ferro dovrebbe possedere alcune caratteristiche che troviamo riassunte in tabella 1.

<b>Proprietà importanti per un chelante del ferro ideale</b>
• Alta affinità e specificità per il $\text{Fe}^{3+}$
• Alta efficienza chelante
• Bassa velocità di metabolizzazione
• Penetrazione tissutale e cellulare
• Non redistribuzione del ferro
• Tossicità ridotta
• Raggiungimento di un bilancio negativo del ferro
• Basso costo
• Somministrazione orale

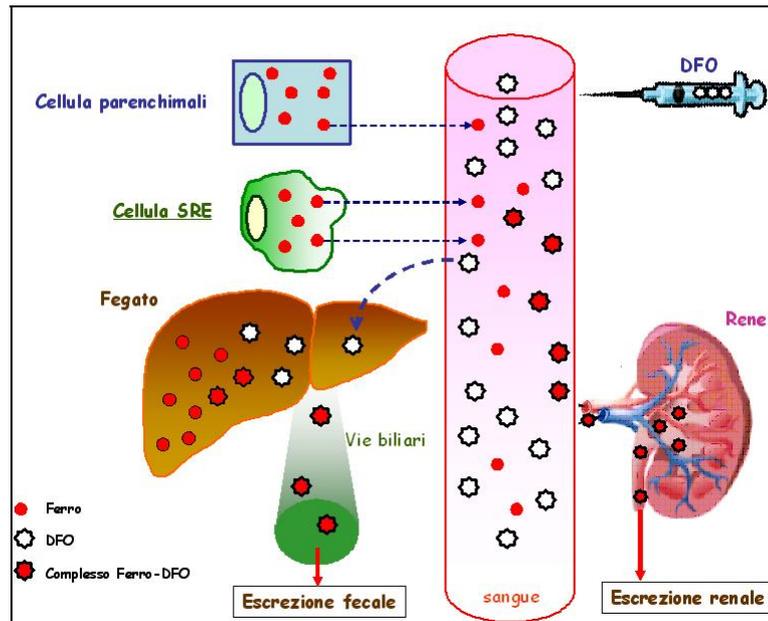
**Tabella 1: Proprietà che un chelante ideale del ferro dovrebbe possedere**

## La desferrioxamina

Il primo farmaco ferrochelante ad essere stato introdotto nell'uso clinico<sup>7</sup> è stato la desferrioxamina B mesilato (DFO).

La desferrioxamina è un sideroforo prodotto e purificato dallo *Streptomyces pilosus*. Questo naturale trasportatore del ferro è un composto esadentato, che contiene cioè sei siti di coordinazione, in grado di legare un atomo di ferro formando un complesso altamente stabile a valori fisiologici di pH. Visto l'elevato peso molecolare che non ne consente l'assorbimento per os, la sua somministrazione avviene esclusivamente per via parenterale (s.c. oppure e.v.). La breve emivita plasmatica, circa 20 minuti, rende inoltre necessaria un'infusione prolungata giornaliera, di almeno 12 ore, per 5-7 giorni la settimana<sup>2</sup>. Questo dato, insieme al fatto che solo una piccola quantità di ferro corporeo è disponibile per la ferrochelazione in ogni momento, spiega perché una più lunga durata d'infusione possa migliorarne l'efficacia. Il trattamento è in grado di indurre un bilancio negativo del ferro permettendo l'eliminazione, attraverso urine (circa 70%) e feci (circa 30%), di 0.15-0.5 mg/kg/die<sup>8</sup>.

Il farmaco viene captato attivamente dagli epatociti consentendo la rimozione del ferro intraepatico in eccesso attraverso il sistema biliare<sup>9</sup>. Il ferro escreto attraverso le urine invece, deriva principalmente dal catabolismo degli eritrociti senescenti, che nei pazienti talassemici rappresentano la principale fonte di ferro libero plasmatico<sup>10</sup>. A causa dell'alto peso molecolare e della sua spiccata idrofilia non è però in grado di penetrare all'interno delle cellule (Fig 3).



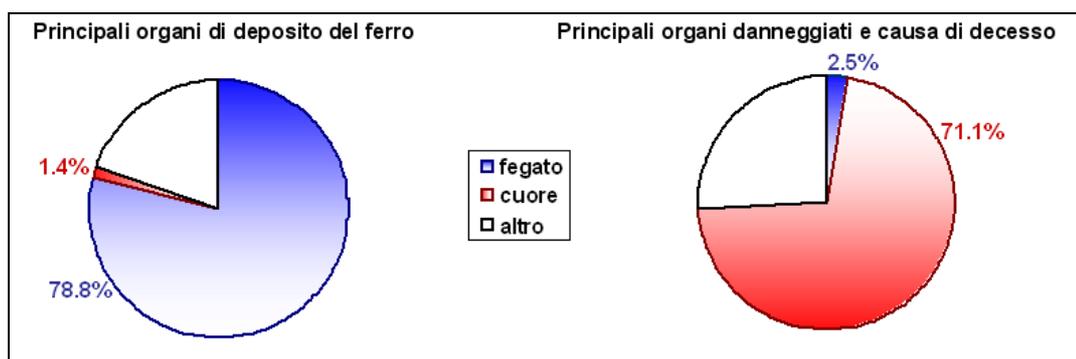
**Figura 3: La desferrioxamina (DFO) ha un duplice sistema di escrezione del ferro. E' in grado di penetrare attivamente nell'epatocita e rimuovere il ferro in eccesso per via biliare. L'altra quota, escreta per via renale, deriva da tutti i tessuti, ma principalmente dal ferro ottenuto per degradazione dei globuli rossi senescenti ad opera delle cellule del sistema reticolo-endoteliale (SRE). Modificato da Herscho et al. in Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005; 1054: 124-135.**

L'uso per via parenterale della desferrioxamina, pur avendo ridotto la morbilità e migliorato la sopravvivenza dei pazienti con talassemia major, presenta dei limiti<sup>11,12</sup>. Questi non sono solo legati alla poco confortevole modalità di somministrazione che condiziona pesantemente la compliance alla terapia specialmente nei giovani. In alcuni pazienti infatti, la desferrioxamina ha degli effetti collaterali (displasia scheletrica, cataratta, ipoacusia neurosensoriale) in modo particolare se usata ad alte dosi. Meno gravi, ma non di secondaria importanza, gli effetti collaterali nel sito di iniezione che creano problemi alla somministrazione del farmaco anche nei pazienti più motivati. Queste limitazioni possono in parte spiegare l'alta incidenza di complicanze riscontrate in chi non si chela adeguatamente.

Gli svantaggi finora descritti permettono di capire come si sia fin dall'inizio sentita la necessità di nuove molecole, più economiche e maneggevoli, che potessero venir accettate meglio dai pazienti pur continuando a garantire un adeguato livello di ferro-chelazione<sup>11,13</sup>.

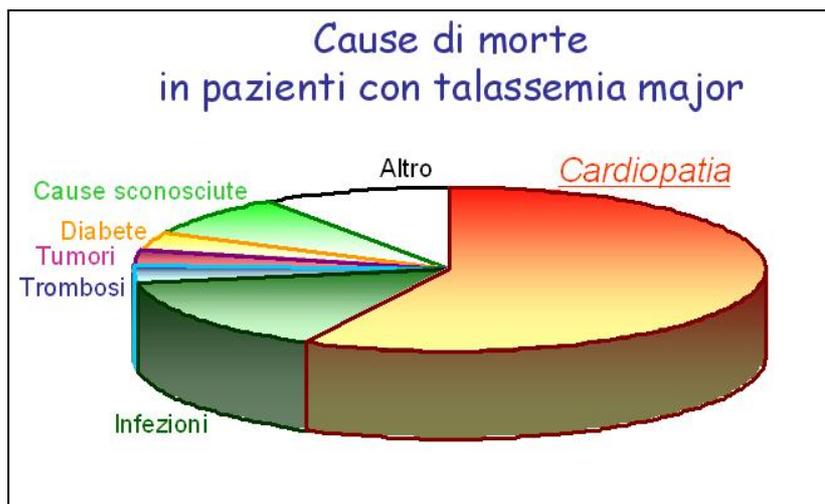
## La cardiopatia nel paziente talassemico

Nonostante la maggior parte del ferro corporeo si accumuli nel fegato quale organo deputato al suo deposito, il cuore appare come l'organo bersaglio letale: la cardiopatia rende conto del maggior numero di decessi nonostante solo l'1.4% del ferro sia contenuto in esso (Fig 4).



**Figura 4: Principali organi di deposito del ferro (da Modell 1976) e principali organi danneggiati dalla siderosi poi causa di decesso, in una coorte di pazienti nati fra il 1970 e 1985 (Ospedale Regionale per le Microcitemie, Cagliari)**

L'uso della desferrioxamina ha migliorato la sopravvivenza in pazienti affetti da talassemia major, tuttavia la cardiopatia continua ad essere la causa più comune di morte (Fig 5). Quando questa si realizza avviene prima dei 35 anni perlopiù per insufficienza cardiaca (60-71% dei casi). Altre cause di morte sono le infezioni (13%) e l'epatopatia (6%)<sup>12</sup>.



**Figura 5: Cause di morte in una popolazione di pazienti con talassemia major nati dopo il 1970. Modificato da Borgna-Pignatti C et al. In Ann. N. Y. Acad. Sci 2005; 1054:40-47.**

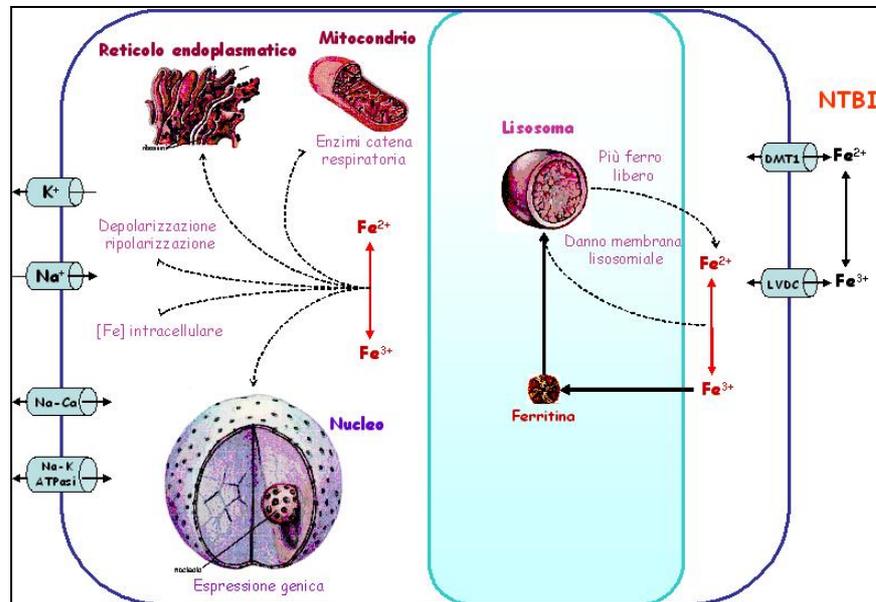
L'origine della cardiopatìa è multifattoriale: anemia, infezioni, siderosi.

Nei pazienti talassemici non adeguatamente trasfusi il circolo ipercinetico, come sistema per compensare l'ipossia tissutale cronica, determina un persistente sovraccarico di lavoro perlopiù a carico delle sezioni sinistre, con deterioramento progressivo della funzione cardiaca. A questo si aggiunge l'ipertensione polmonare per aumento delle resistenze vascolari nel letto polmonare, anch'esse legate all'ipossia cronica, che danno luogo al sovraccarico pressorio delle sezioni destre<sup>14</sup>.

L'applicazione di un regolare regime trasfusionale in pazienti con talassemia major tuttavia, pur avendo ridotto quasi a zero il danno causato dall'anemia, ha sicuramente accelerato la comparsa delle problematiche connesse con l'accumulo di ferro. Da non dimenticare i fatti infettivi quali le miocarditi acute, che possono accelerare lo scompenso cardiaco richiamando l'attenzione su un aumentato tropismo dei virus per il miocardio siderotico<sup>15</sup>.

Il ferro libero penetra dentro la cellula miocardica attraverso canali per il calcio voltaggio-dipendenti (LVDCC) e viene rapidamente trasformato in ferro di deposito, limitandone così il suo potere ossido-riduttivo<sup>16,17</sup> (Fig 6). Quando viene superata la capacità di deposito e aumenta la concentrazione del ferro libero intracellulare si realizzano i danni a diversi livelli<sup>18</sup>. Il meccanismo attraverso il quale il ferro in eccesso interferisce con le funzioni della cellula miocardica

riguarda come detto, la capacità del ferro ionizzato di catalizzare la formazione di radicali liberi responsabili del danno ossidativo<sup>19,20</sup>.



**Figura 6: Da destra a sinistra assorbimento, deposito, tossicità del ferro in un miocita. Il ferro penetra nelle cellule e viene rapidamente immagazzinato sotto forma di ferritina. La tossicità si realizza una volta superate le capacità di deposito della cellula (freccia tratteggiata). Modificato da Wood et al. in Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005; 1054: 386-395.**

Tipicamente silente per diversi anni, il danno cardiaco da emosiderosi comincia a manifestarsi nel momento in cui le concentrazioni di ferro raggiungono un livello tossico.

Clinicamente avremo la comparsa di disfunzione diastolica e/o sistolica che evolverà in insufficienza cardiaca congestizia, oppure per interessamento del sistema di conduzione, morte improvvisa probabilmente dovuta ad aritmie letali.

Una buona chelazione in tutti i pazienti talassemici risulta quindi indispensabile per ritardare l'inizio e rallentare la progressione della cardiopatia. La terapia ferrochelante deve essere prescritta precocemente, solitamente dopo le prime 10-15 emotrasfusioni o quando i livelli di ferritina si aggirano attorno a 1000  $\mu\text{g/l}$ , adeguando il dosaggio del farmaco a quelli che sono i depositi di ferro nell'organismo<sup>2</sup>.

Il trattamento è indispensabile venga poi intensificato per tempo in tutti i pazienti considerati ad alto rischio cardiovascolare, ma ancora asintomatici. Ma è proprio questo obiettivo ad apparire di difficile realizzazione.

La sorveglianza cardiologica convenzionale che consiste in annuali ECG, Holter ed ecocardiogrammi risulta purtroppo inefficace nel mettere in evidenza una condizione di sovraccarico di ferro pre-clinico<sup>21</sup>. La disfunzione ventricolare può essere mascherata dal fatto che soggetti talassemici senza sovraccarico di ferro intracardiaco presentano normalmente valori di frazione di eiezione superiori a quelli che vengono considerati normali per l'età<sup>22</sup>. La diagnosi è dunque spesso ritardata fino alla comparsa tardiva dei sintomi e delle anomalie ecocardiografiche che spesso evolvono rapidamente in insufficienza cardiaca acuta.

Stabilire il rischio cardiovascolare individuale appare dunque problematico. Non esiste un unico parametro in grado di definire con precisione il grado di sovraccarico di ferro. Valutazioni indirette a partire dai livelli di ferritina nel tempo possono essere utili, ma possono indurre in errore<sup>23,24</sup>.

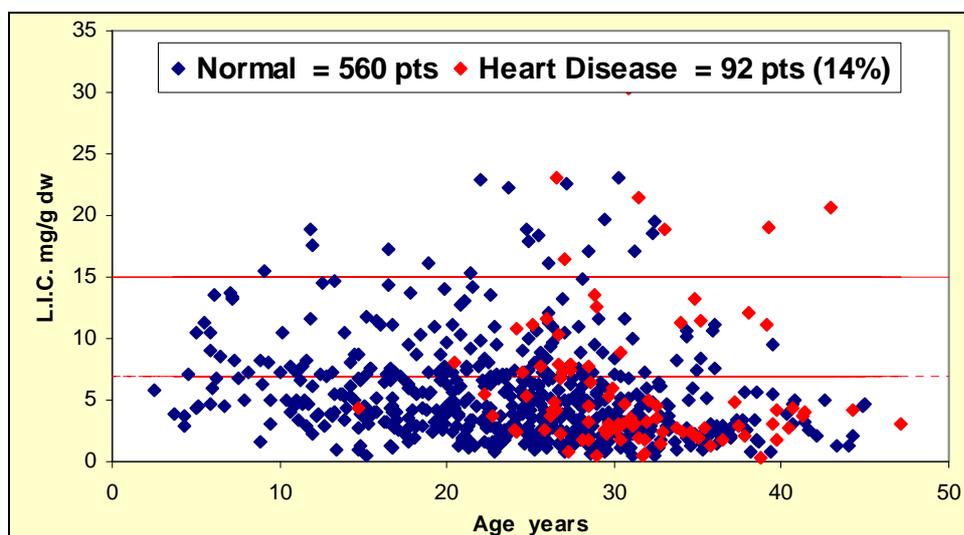
La ferritina infatti, essendo una proteina della fase acuta, è influenzata da molti altri fattori che includono processi infiammatori, epatopatia e deficit di vitamina C. La valutazione della concentrazione di ferro intraepatico mediante biopsia (LIC) fornisce una valutazione un po' più accurata dei depositi di ferro nell'organismo<sup>25,26,27</sup> ed è stata considerata la misura di riferimento, se eseguita su campioni biotipici di peso adeguato ed in assenza di cirrosi epatica.

Recenti studi hanno tuttavia dimostrato che la distribuzione epatica del ferro nei pazienti talassemici può essere disomogenea, con massime concentrazioni nelle zone periferiche. Tuttavia sebbene considerata relativamente sicura, la biopsia rappresenta comunque una procedura invasiva che può comportare dolore e non è completamente esente da rischi.

La ricerca si è quindi orientata verso nuove tecniche non invasive ed accurate, come lo SQUID, per la determinazione dell'accumulo di ferro.

La Biosusciometria Magnetica (SQUID) è innocua, e misura direttamente le proprietà magnetiche di ferritina ed emosiderina. Valuta inoltre la concentrazione del ferro su una porzione di organo, centrale, circa 10.000 volte più grande della porzione esaminabile con la biopsia<sup>28</sup>.

Tuttavia anche qui esiste una dissociazione tra la siderosi cardiaca e quella epatica (Fig 7), così che la previsione del sovraccarico marziale nel cuore a partire dal contenuto di ferro intraepatico mediante SQUID, non è affidabile in tutti i pazienti.



**Figura 7: Discrepanza tra insorgenza di cardiopatia e depositi di ferro nel fegato valutati mediante SQUID. Da Piga A.**

Ma allora quando intensificare il trattamento? Fino a pochi anni fa una chelazione intensiva mediante infusione continua, 24 ore su 24, di desferrioxamina era sempre presa in considerazione nei pazienti affetti da siderosi giudicata di grado severo sulla base del riscontro di:

- valori di ferritina persistentemente  $> 2500\mu\text{g/l}$ <sup>29</sup>
- ferro epatico  $> 15\text{mg/g}$  di peso secco<sup>30</sup>

o con complicanze cardiache:

- aritmia cardiaca significativa<sup>31</sup>
- scompenso della funzione ventricolare<sup>31</sup>

In questi casi l'infusione continua di desferrioxamina, soprattutto per via endovenosa attraverso catetere venoso centrale<sup>41</sup>, è risultata maggiormente efficace rispetto all'infusione periodica, poiché riduce l'esposizione dei vari organi, in primis il cuore, al pool di ferro libero non legato alla transferrina (NTBI)<sup>32</sup>.

L'effetto benefico ottenuto con il DFO in pazienti con scompenso cardiaco o aritmia scarsamente responsiva alla terapia cardiologica, dimostra la possibile reversibilità della cardiopatia anche nei casi avanzati<sup>31</sup>. Questo dato trova conferma nel lieve grado di fibrosi in assenza di infiammazione riscontrato in prelievi autoptici di miocardio<sup>33</sup>.

## Recenti progressi

In quest'ultimo decennio ci sono state una serie di novità che hanno permesso una migliore gestione del paziente talassemico e delle sue complicanze. Innanzitutto la formulazione di *nuove molecole ferro-chelanti* assumibili per os una delle quali con un dimostrato effetto cardioprotettore, che ha permesso di incidere significativamente nella riduzione della mortalità per cardiopatia.

Non di minore importanza l'elaborazione di una *tecnica di risonanza magnetica (T2\*)* in grado di quantificare, in vivo, il grado di sovraccarico di ferro intracardiaco. Questa tecnica permette oggi di identificare precocemente i pazienti, ancora asintomatici, a rischio di complicanze cardiovascolari.

## Nuovi farmaci ferro-chelanti

Dal 1999 è a disposizione per l'uso clinico il primo farmaco ferro-chelante somministrabile per os. Il **deferiprone** (1,2 dimetil-3-idrossipiridina-4-uno, L1), è un legante bidentato in grado di legare il ferro in una proporzione molare di 3:1 e viene impiegato abitualmente alla dose di 75mg/kg/die in 3 somministrazioni. Alcuni studi hanno messo in evidenza come il trattamento con deferiprone fosse in grado di assicurare un bilancio negativo del ferro in molti, ma non in tutti i pazienti<sup>34</sup>.

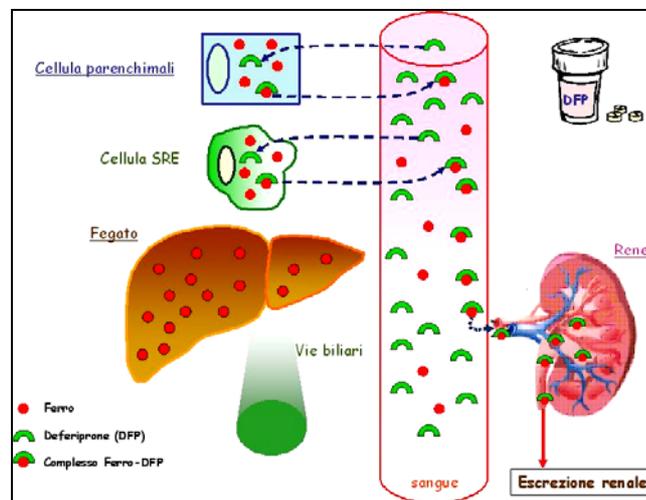
Il suo uso è attualmente approvato per il trattamento del sovraccarico di ferro in pazienti affetti da talassemia major per i quali la terapia con desferrioxamina è controindicata o determina una grave tossicità conseguente al suo uso. L'agranulocitosi è il più grave effetto avverso segnalato, con un'incidenza di 0.6 per 100 pazienti/anno<sup>35</sup>. Più comunemente vengono riferiti sintomi gastrointestinali (nausea, vomito, epigastralgia), dolori articolari, deficit di zinco e incremento delle transaminasi perlopiù in pazienti HCV-positivi.

Il suo impiego in monoterapia aveva mostrato risultati incoraggianti nei pazienti trattati a medio-termine<sup>30,36</sup> nonostante poi la sua utilità fosse stata messa in discussione dal riscontro di elevati livelli di ferro intraepatico nel lungo termine<sup>37</sup>, contrariamente a quanto riscontrato nei pazienti in trattamento con desferrioxamina. Questa segnalazione, insieme ad una possibile aumentata

incidenza di fibrosi epatica<sup>38</sup> mai più riconfermata, ne aveva limitato il suo utilizzo.

Studi più recenti eseguiti su soggetti affetti da talassemia major hanno permesso di ipotizzare come il deferiprone potesse fornire una più alta protezione contro la cardiopatia ferro-indotta rispetto al regime tradizionale con desferrioxamina sottocute. Il peggioramento di una cardiopatia preesistente o l'esordio di problematiche cardiologiche è stato osservato infatti nel 4% dei pazienti trattati con deferiprone, rispetto al 20% di quelli in terapia con desferrioxamina<sup>39,40</sup>.

Diversamente dalla desferrioxamina, l'escrezione biliare del ferro indotta dal deferiprone è trascurabile a causa della sua rapida inattivazione per glicuronoconiugazione a livello epatico<sup>41</sup>. Per tale motivo il suo utilizzo incide meno nella riduzione della siderosi epatica<sup>34</sup>. L'escrezione urinaria del ferro, invece, è quasi uguale a quella ottenuta con desferrioxamina probabilmente perché deriva dallo stesso pool chelatabile, con un'eccezione: la possibilità di penetrare dentro tutte le cellule, eccetto quelle epatiche, in virtù del basso peso molecolare e della relativa lipofilia<sup>42</sup>(Fig 8).



**Figura 8: Il deferiprone è in grado di penetrare dentro le cellule parenchimali e del sistema reticolo-endoteliale consentendo la riduzione dei depositi di ferro tissutali. Il complesso ferro-deferiprone viene quindi escreto per via renale. A livello epatico non è in grado di agire vista la rapida inattivazione per glicuronoconiugazione. Modificato da Hershko et al. in Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005; 1054: 124-135.**

Il **deferasirox** (ICL670) è un'altra molecola ferro-chelante orale che è stata registrata negli Stati Uniti nel novembre 2006 e in Europa nel 2007. Il farmaco, un complesso tridentato, viene somministrato per bocca al dosaggio di 20-30 mg/Kg una volta al giorno<sup>43</sup>. Gli effetti avversi riportati con questa nuova molecola sono stati rialzo delle transaminasi, tubulopatia, intolleranza gastrica. Il frazionamento in due dosi giornaliere ha consentito l'ottenimento di una maggiore efficacia e tollerabilità in alcuni pazienti<sup>44</sup>. Il deferasirox ha dimostrato una significativa e clinicamente rilevante efficacia nel ridurre la concentrazione di ferro intraepatico<sup>45,46</sup>. Pennel et al ha dimostrato, contrariamente a quanto riportato in altri studi<sup>47</sup>, come un trattamento continuativo con deferasirox ad una dose massima di 40 mg/kg per 2 anni, fosse stato in grado di agire efficacemente a livello cardiaco riducendo la siderosi del miocardio in chi aveva un sovraccarico di ferro da lieve a moderato rilevata mediante tecnica di risonanza magnetica<sup>48,49</sup>. I risultati tuttavia non erano paragonabili, in termini di efficacia, a quelli raggiunti con il deferiprone.

L'escrezione è quasi esclusivamente fecale. La sua efficacia e sicurezza sono state valutate in pazienti pediatrici e adulti con talassemia major, in un ampio, internazionale, multicentrico, randomizzato (ICL670 versus DFO) trial clinico di fase III<sup>50</sup>.

## **T2\* cardiaco**

L'avvento di una nuova metodica d'indagine per la valutazione in vivo dei depositi di ferro nel cuore e nel fegato ha dimostrato come, nonostante esista una correlazione tra i livelli di ferritina e il ferro epatico, non sia possibile predire la quantità di ferro accumulato, specialmente nel cuore, esclusivamente sulla base di questi markers convenzionali di sovraccarico di ferro<sup>51,52,53</sup>.

La valutazione del sovraccarico di ferro cardiaco, tradizionalmente può essere fatta con diversi metodi.

*Valutazioni indirette* si ottengono dosando la ferritina serica, la concentrazione di ferro epatico mediante biopsia epatica (LIC) o lo SQUID e determinando la funzione cardiaca che sarà alterata negli stadi avanzati di siderosi del miocardio.

*Valutazioni dirette* sono invece possibili per mezzo della biopsia del miocardio e della risonanza magnetica cardiaca.

La biopsia del miocardio è una metodica invasiva che deve essere eseguita da personale esperto. Presenta un alto rischio di complicanze che non permette il suo uso abituale e non consente la valutazione dell'epicardio che rappresenta la zona in cui il ferro si concentra maggiormente. Da ricordare inoltre come la distribuzione del ferro sia eterogenea.

Fino a pochi anni fa non si era in grado di studiare il cuore mediante risonanza magnetica a causa del suo continuo movimento che appariva come un ostacolo insuperabile alla sua visualizzazione. La sincronizzazione dell'emissione degli impulsi a radiofrequenza con l'onda R del tracciato elettrocardiografico, ha permesso invece l'acquisizione di immagini "statiche" del cuore, prive cioè di artefatti dovuti al movimento.

La capacità del ferro accumulato nelle cellule parenchimali e nel sistema reticolo-endoteliale di aumentare la suscettibilità magnetica del tessuto esplorato, costituisce la base per l'utilizzazione della RM nella valutazione dei depositi di ferro.

Il ferro infatti, per le sue proprietà paramagnetiche, determina una marcata riduzione dei tempi di rilassamento T1 e T2 con caduta di segnale RM proporzionale al sovraccarico marziale nel tessuto stesso.

Rispetto alla tecnica spin-echo T2, quella gradient-echo T2\* è maggiormente sensibile al deposito di ferro. Il T2\* è legato al T2 secondo la formula:

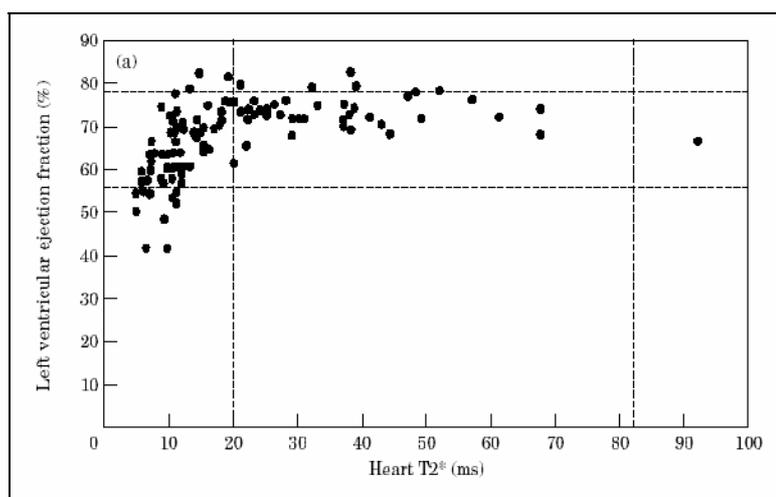
$$1/T2^* = 1/T2 + 1/T2'$$

intendendo per T2' le disomogeneità del campo magnetico. Il sovraccarico di ferro causa caduta del segnale nei tessuti siderotici perché i depositi di ferro si magnetizzano se sottoposti a campo magnetico esterno. Questo effetto è concentrazione dipendente<sup>54</sup>. Il T2\* è di conseguenza inversamente proporzionale alla quantità di ferro cardiaco<sup>55,56</sup>. Un altro indice in grado di quantificare il sovraccarico di ferro, ottenuto dal T2\* cardiaco, è l'R2 [R2= (1/T2\*c) x 1000]. Questo varia in misura direttamente proporzionale al sovraccarico di ferro.

Considerare l'indice R2 da dei vantaggi in quanto questo parametro tiene conto del fatto che una variazione del T2\* cardiaco ha un peso diverso a seconda del particolare intervallo, espresso in ms, in cui avviene. Questo ci permette di capire perché il miglioramento ad esempio è sensibilmente maggiore in chi è passato da un T2\* cardiaco di 5ms a 6ms piuttosto che da 15ms a 20ms.

La recente acquisizione di questa nuova tecnica di risonanza magnetica ha permesso per la prima volta di valutare, in modo non invasivo, il sovraccarico di ferro intracardiaco e intraepatico in vivo<sup>5</sup>.

Secondo uno studio di Anderson et al. la media dei valori normali di T2\* cardiaco, valutato a livello del setto interventricolare, è di  $52 \pm 16$  ms<sup>5</sup>. Il limite inferiore nel range di normalità è di 20 ms. Valori tra 10-20 ms sono indicativi di moderato sovraccarico marziale, considerato grave per valori di  $T2^* < 10$ ms, e sono associati a ridotta frazione di eiezione sinistra<sup>57</sup> (Fig 9).



**Figura 9: Distribuzione del T2\* cardiaco in una coorte di pazienti affetti da talassemia major. Da Anderson et al 2001.**

La relazione inversa tra il T2\* e la concentrazione di ferro epatico ( $r = 0.81$ ) è stata verificata in pazienti che si sono sottoposti a biopsia epatica<sup>5</sup>. Questi dati confermano come il T2\* vari al variare della concentrazione di ferro nei tessuti, ma non forniscono la calibrazione per il miocardio che deve essere ancora eseguita<sup>58</sup>. La validazione richiede infatti la disponibilità di biopsie di miocardio autoptiche e deve tener conto delle difficoltà legate alle piccole dimensioni dei

campioni raccolti e della distribuzione disomogenea dei depositi di ferro nel cuore (a macchie di leopardo)<sup>59,60</sup>.

Il forte legame tra i bassi valori di T2\* cardiaco e la riduzione della frazione di eiezione chiaramente rafforzano il valore empirico di questa metodica di indagine in attesa della calibrazione.

L'aver sviluppato e validato un metodo non invasivo per misurare il ferro intracardiaco in vivo ha il vantaggio di individuare i pazienti che necessitano di iniziare precocemente una terapia chelante intensiva, prima ancora che la cardiopatia o l'insufficienza cardiaca si sviluppino<sup>5</sup>. La metodica T2\* è riproducibile su apparecchi diversi e ripetibile. Questo la rende ampiamente disponibile per la valutazione non invasiva dei depositi di ferro nel cuore e nel fegato<sup>61,62,63</sup>.

Anderson e coll. hanno inoltre dimostrato con il T2\*, come una grave siderosi del miocardio possa dunque esistere anche con valori di ferritina e ferro epatico accettabili<sup>64</sup> (Fig 10).



**Figura 10:** tra depositi di ferro nel cuore e nel fegato in alcuni pazienti. Modificato da Anderson LJ et al. In Eur. Heart J. 2001; 22:2171-2179.

Nel 2009 invece Kirk et al. hanno voluto valutare il valore da attribuire alla determinazione del T2\* cardiaco nel predire l'outcome cardiologico dei pazienti con talassemia major confrontandoli con i classici predittori di outcome (LIC e ferritina serica). Il 47% dei soggetti con un T2\* cardiaco inferiore a 6 ms aveva

sviluppato insufficienza cardiaca entro i successivi 12 mesi<sup>65</sup>. La ferritina al contrario si è dimostrata essere un significativo ma debole predittore di insufficienza cardiaca.

Numerosi studi hanno utilizzato il T2\* per valutare, nei pazienti talassemici, la reversibilità della cardiopatia ferro-indotta e l'efficacia della terapia chelante con desferrioxamina e/o altri farmaci ferro-chelanti<sup>48,66,67,68</sup>.

Sono stati valutati ad esempio le variazioni del T2\* durante il trattamento intensivo con DFO endovena in pazienti con grave cardiomiopatia. Il miglioramento della frazione di eiezione andava di pari passo con l'aumento del T2\* cardiaco rilevato a distanza di un anno dall'inizio della terapia intensiva. Dallo studio è emerso un dato significativo riguardo la distribuzione non omogenea del ferro nei vari organi e la capacità della desferrioxamina di eliminare il ferro in eccesso. La clearance del ferro epatico è apparsa infatti considerevolmente più alta di quella cardiaca, dimostrando come differente possa essere la capacità ferrochelante della desferrioxamina nei diversi organi<sup>67</sup>.

La disponibilità della risonanza magnetica ha permesso anche di documentare la prevalenza del sovraccarico di ferro e della disfunzione ventricolare in pazienti affetti da talassemia major in terapia convenzionale con desferrioxamina sottocute. Un T2\* < 20 ms è stato riscontrato nei 2/3 dei pazienti. Questa condizione si associava ad un'alta prevalenza di ridotta funzione ventricolare sinistra, la severità della quale era proporzionale all'entità della siderosi miocardica<sup>40,66,68</sup>.

## La cardiopatia nel paziente talassemico oggi

La diagnosi pre-sintomatica di grave siderosi del miocardio è dunque essenziale per una prognosi migliore.

La disponibilità della risonanza magnetica cardiaca ha permesso di valutare in vivo l'accumulo di ferro intracardiaco consentendo di instaurare un regime chelante intensivo precoce, nonostante la totale assenza di sintomi o segni ecocardiografici di disfunzione. Come detto la terapia ferrochelante con desferrioxamina non è in grado di prevenire questa complicanza anche in una parte dei pazienti che si chelano adeguatamente. L'introduzione nell'uso clinico del deferiprone sta fornendo risultati concreti sia nel trattamento che nella prevenzione delle complicanze cardiologiche. Studi su cellule miocardiche di ratti<sup>69</sup> e gerbilli<sup>70</sup> con sovraccarico di ferro, avevano in passato permesso di valutare l'efficacia del deferiprone nel rimuovere il ferro dalle cellule miocardiche alle concentrazioni che potevano essere raggiunte in circolo.

Il miglioramento della funzionalità ventricolare sinistra riscontrabile nei pazienti che si sono sottoposti a terapia chelante con deferiprone, si accompagna alla minore quantità di ferro cardiaco valutato mediante risonanza magnetica cardiaca<sup>36,66</sup>.

Le differenti proprietà farmacologiche tra i due farmaci<sup>71</sup> possono in parte spiegare la differente efficacia riscontrata.

E' molto probabile, indipendentemente dalla dose utilizzata, che in virtù della migliore compliance ottenibile, del suo migliore uptake cellulare (eccezion fatta per il fegato) e delle maggiori concentrazioni plasmatiche raggiunte, il deferiprone possa essere più efficace del DFO nel rimuovere il ferro dalle cellule miocardiche, mentre l'opposto può essere vero riguardo alla mobilizzazione del ferro epatico.

La disponibilità di più molecole, specialmente se somministrabili per os, permetterebbe un approccio flessibile alla terapia ferro-chelante nei pazienti con talassemia major. Il loro uso combinato porterebbe numerosi vantaggi terapeutici (Tab 2).

<b>Potenziati vantaggi della terapia chelante combinata</b>
• Accesso a differenti pools di ferro
• Prevenzione dell'accumulo di NTBI
• Aumentata efficacia
• Ridotta tossicità
• Migliore compliance
• Migliore qualità di vita

**Tabella 2: Vantaggi della terapia chelante combinata.**

Su questa base Wonke e coll. hanno pensato di sottoporre per la prima volta i pazienti ad un regime ferrochelante che comprendeva l'uso del deferiprone e della desferrioxamina<sup>72</sup>. Da allora diversi trials clinici su pazienti in terapia combinata si sono succeduti<sup>73,74,75,76,77</sup>.

La terapia combinata con deferiprone e desferrioxamina ha determinato una considerevole riduzione della ferritina e/o del ferro epatico con un significativo miglioramento della funzionalità ventricolare che, come documentato in alcuni lavori, accompagna la riduzione della siderosi del miocardio.

Studi metabolici che hanno valutato accuratamente il ferro introdotto (con la dieta e le trasfusioni) e quello escreto (con urine e feci) dapprima con deferiprone poi con desferrioxamina e da ultimo con terapia combinata, hanno dimostrato come in alcuni pazienti i due chelanti possono avere effetto anche sinergico sull'eliminazione del ferro<sup>78</sup> (Fig 11).

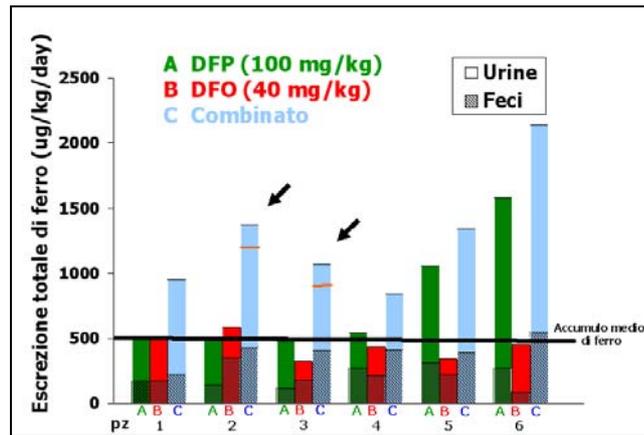


Figura 11: Valutazione dell'introduzione ed escrezione di ferro (feci + urine) in tempi successivi con deferiprone, desferrioxamina e combinato in 6 pazienti. L'effetto sinergico dell'associazione deferiprone-desferrioxamina è stato riscontrato in 2 pazienti (vedi freccia). Da Grady et al 1999.

Una possibile spiegazione dell'effetto sinergico può essere data dalla teoria dello "shuttle": la combinazione di un chelante debole, che ha una migliore abilità nel penetrare dentro le cellule, con uno più potente, che penetra poco nelle cellule ma ha una più efficace escrezione urinaria, può risultare in un migliore effetto complessivo attraverso il trasferimento del ferro da una molecola all'altra (Fig 12).

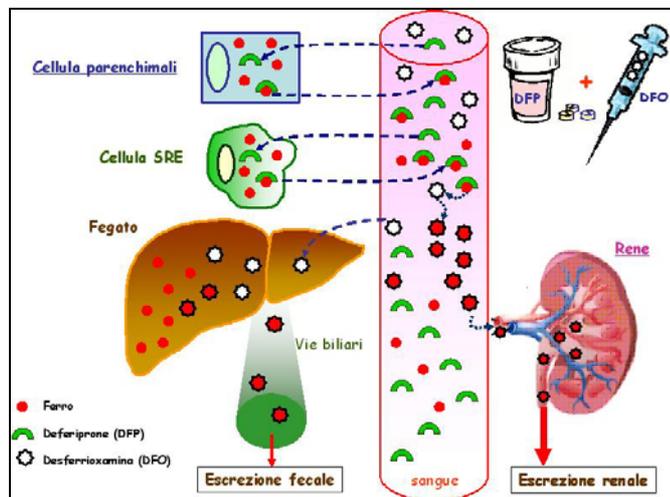


Figura 12: Terapia combinata. In presenza della desferrioxamina, il deferiprone può funzionare come molecola "shuttle": il ferro intracellulare viene portato in circolo dal deferiprone e poi passa alla desferrioxamina, che possiede una maggiore affinità per il ferro, per essere escreto per via renale. Modificato da Hershko et al. in Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005; 1054: 124-135.

## **SCOPO DEL LAVORO**

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'efficacia e la sicurezza della terapia ferrochelante combinata (deferiprone + desferrioxamina) in una coorte di pazienti con grave siderosi del miocardio ( $T2^*$  cardiaco  $< 10$  ms).

Vista la differente adesione al trattamento emersa nel corso dell'osservazione, si è tuttavia reso necessario suddividere i pazienti di cui sopra in due sottogruppi: a buona e a scarsa compliance. Allo scopo di valutarne l'effetto a lungo termine, abbiamo analizzato in ciascun gruppo e tra i gruppi le variazioni riscontrate a distanza di tempo su diversi parametri di laboratorio, strumentali e di funzionalità cardiaca (ferritina,  $T2^*$  cardiaco ed epatico, frazione di eiezione ventricolare sinistra).

## PAZIENTI

305 pazienti adulti affetti da talassemia major seguiti nel nostro centro, sono stati sottoposti a valutazione dei depositi di ferro intracardiaco mediante determinazione del T2\* cardiaco con tecnica di Risonanza Magnetica.

La distribuzione del T2\* nella popolazione studiata (Tab 3), dà un'idea del grado di sovraccarico di ferro riscontrato nei diversi pazienti a prescindere dal particolare regime di chelazione cui erano sottoposti (monoterapia con deferasirox, deferiprone, desferrioxamina; terapia combinata o alternata con desferrioxamina + deferiprone).

T2* (ms)	n° pazienti (%)	Ferritina (µgr/l)
>20	159 (52.1)	1876±1025
10-20	83 (27.2)	2611±1719
<10	63 (20.7)	2645±1373

**Tabella 3: Distribuzione del T2\* cardiaco e della ferritina media annua in una coorte di 305 pazienti affetti da talassemia major.**

In particolare l'indagine ha consentito di mettere in evidenza un sovraccarico di ferro intracardiaco di entità variabile nel 47,9% dei pazienti. Il 20,7% rappresentato da soggetti che presentavano un T2\* inferiore a 10ms, indicativo di grave emosiderosi cardiaca.

Nella tabella 4 possiamo invece osservare come non tutti i pazienti con T2\*<10ms presentassero valori di ferritina medio-alta come ci si sarebbe potuto aspettare. Il 15,5% di questi infatti, presentava quantità inferiori a 1000µgr/l (Tab 4) da sempre considerate di relativa sicurezza per un eventuale sovraccarico di ferro che poneva a rischio di complicanze il paziente talassemico.

Ferritina (µgr/l) in pz con T2*<10ms	%
<1000	15,5
1000-2500	43,1
>2500	41,4

**Tabella 4: Ripartizione dei valori di ferritina media annua in pazienti con T2\*<10ms.**

In tutti i pazienti con T2\* inferiore a 10 ms (63/305), a maggior rischio per problematiche cardiache, è stato proposto il passaggio ad un regime chelante intensivo che prevedeva l'uso della desferrioxamina associata al deferiprone (terapia combinata). Di questi il 70% (44/63) ha iniziato il trattamento consigliato. Dei rimanenti, il 24% (15/63) è stato sottoposto ad altri regimi di chelazione per mancata disponibilità individuale ad iniziare tale trattamento intensivo o per necessità legata a pregressi effetti avversi ad esso riconducibili. Il restante 6% (4/63) invece, pur avendo accettato di iniziare la terapia combinata aveva un'unica determinazione del T2\* cardiaco al tempo zero che non era mai stata ripetuta a distanza di tempo.

Scopo della tesi è presentare i dati relativi all'osservazione longitudinale di 44 pazienti con T2\*<10ms che hanno accettato di sottoporsi alla terapia chelante combinata, suddivisi in due gruppi a seconda della compliance al trattamento.

La terapia combinata prevedeva l'uso di deferiprone al dosaggio di 75-100mg/kg/die in 3 somministrazioni giornaliere e di desferrioxamina, 40-50 mg/kg/die somministrata sottocute per almeno 8-12 ore, 4-6 giorni la settimana.

Per ogni gruppo abbiamo valutato la variazione del T2\* cardiaco (T2\*c), dell'indice R2, della frazione di eiezione del ventricolo sinistro (FE), del T2\*epatico (T2\*e) e della ferritina prima e dopo l'inizio della terapia. A conclusione del lavoro abbiamo confrontato i risultati ottenuti tra i gruppi.

La compliance al trattamento è stata giudicata sulla base delle informazioni raccolte nei diari clinici e dall'interrogazione diretta del paziente. Si è deciso di definire buona la compliance di chi ha assunto più del 70 % della terapia prescritta e scarsa di chi al contrario ne ha assunto meno del 70%.

I due gruppi esaminati, a scarsa e buona compliance, sono omogenei per numero di pazienti, età e durata del follow-up. Sono stati seguiti infatti per una mediana di tempo rispettivamente di 18.7 mesi (buona compliance) e 23.2 mesi (scarsa compliance) con un p=0.765. L'età media era di 32.8±4.5 anni nel gruppo a buona compliance e 31.8±4.9 anni in quello a scarsa compliance.

## METODI

*Lo studio ecocardiografico* convenzionale (M-mode, bidimensionale e Doppler) è stato eseguito con apparecchiatura Agilent Sonos 5500.

La frazione di eiezione è stata calcolata secondo la formula di Simpson Monoplano modificata.

Per le *misurazioni RM* è stato usato un Magnetometro General Electric (1.5 T magnet - Echo Speed) con appropriato software per indagini cardiache; General Electric, Milwaukee, IL, USA). Il calcolo del T2\* è stato effettuato con programmi PC (Thalassemia Tools; CMR TOOLS, London UK).

L'R2 cardiaco è stato ottenuto svolgendo la seguente equazione:  $R2 = (1/T2^*c) \times 1000$ . Diversamente da quanto accade con il T2\*cardiaco, questo indice varia in misura direttamente proporzionale al sovraccarico di ferro. Maggiore è il grado di emosiderosi, maggiore sarà il suo valore (variazioni positive).

*L'analisi statistica* è stata realizzata usando due test non parametrici: il test di Wilcoxon dei ranghi con segno per dati appaiati per confrontare le variazioni per indici e Mann-Whitney U-test per confrontare tra loro i due gruppi. La distribuzione dei dati viene espressa indicando la mediana e lo scarto interquartile (Inter Quartile Range o IQR). L'IQR è un indice di dispersione dei dati, ovvero una misura di quanto i valori si allontanino da un valore centrale. Questo è ottenuto dalla differenza tra il primo e il terzo quartile che rappresentano rispettivamente il 25% e il 75% della distribuzione.

Per ogni parametro è stato inoltre calcolato il Delta che corrisponde alla variazione registrata per un dato indice, tra la fine e l'inizio del trattamento, diviso il periodo di tempo in cui è stata fatta la terapia combinata [  $\Delta = (\text{finale} - \text{iniziale})/\text{mesi}$ ].

## **RISULTATI**

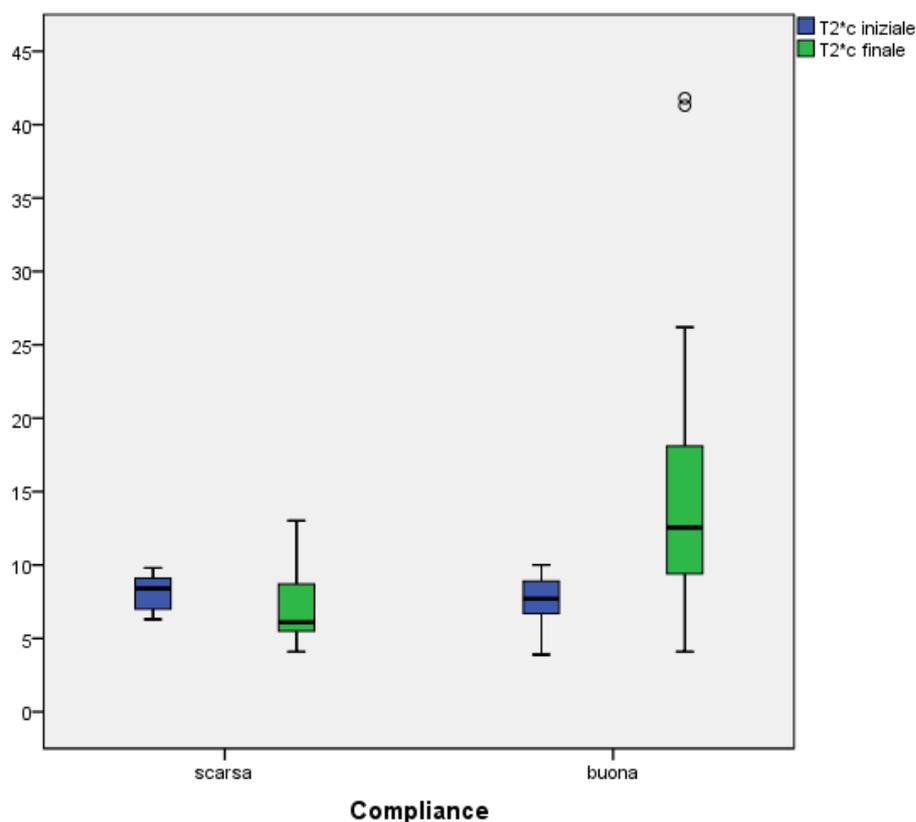
I pazienti che si sono sottoposti a terapia ferrochelante combinata sono stati suddivisi in due gruppi, a scarsa e buona compliance, in funzione della differente adesione al trattamento. Per ogni gruppo abbiamo valutato la variazione del T2\* cardiaco (T2\*c), dell'indice R2, della frazione di eiezione del ventricolo sinistro (FE), del T2\*epatico (T2\*e) e della ferritina dopo  $21 \pm 3.2$  mesi di trattamento combinato con deferiprone (DFP) e desferrioxamina (DFO). I risultati sono raccolti nel paragrafo "Variazioni per indici".

In un secondo tempo abbiamo confrontato i risultati tra gruppi, per valutare l'efficacia del combinato con buona compliance versus combinato con scarsa compliance.

## Variazioni per indici

### T2\* cardiaco

Nel gruppo a buona compliance costituito da 26 pazienti, il T2\* cardiaco è aumentato significativamente passando da una mediana di 7.7 ms (IQR=2.2) a 12.6 ms (IQR=8.7) ( $p < 0.001$  Test di Wilcoxon). Diversamente, nel secondo gruppo a scarsa compliance (18 pazienti) si è registrata una riduzione del T2\* cardiaco che è passato da una mediana di 8.4 ms (IQR=2.1) a 6.1 ms (IQR=3.2). Tale variazione non è risultata statisticamente significativa ( $p = 0.089$  Test di Wilcoxon).

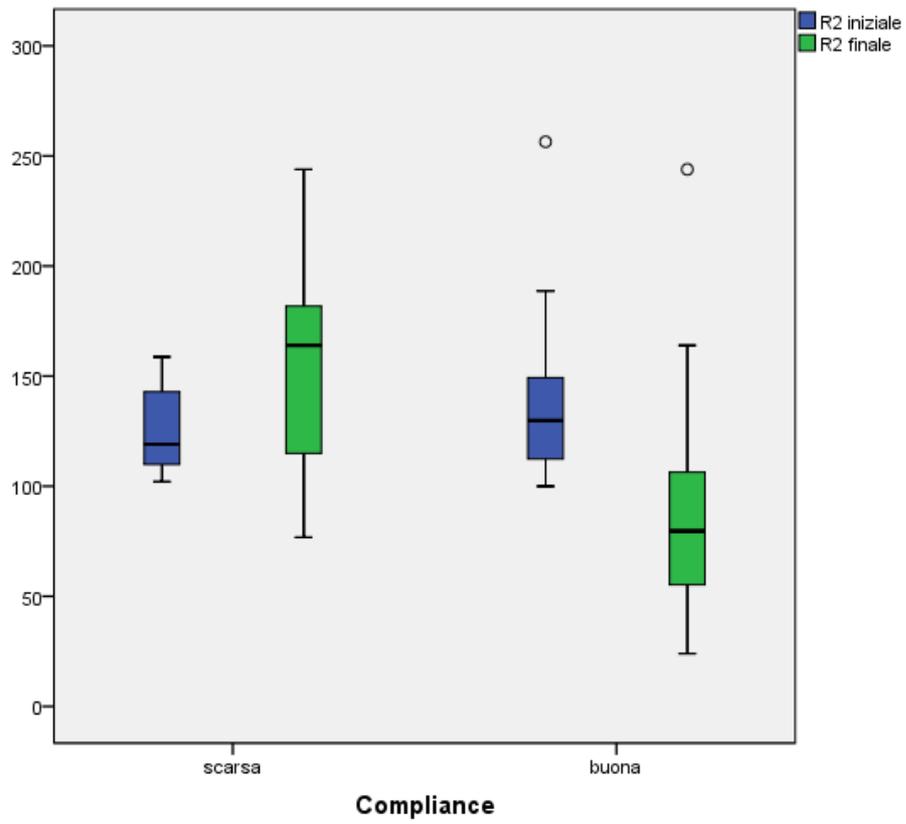


**Figura 13: Andamento del T2\* cardiaco al tempo zero e dopo il trattamento nei due gruppi a scarsa e buona compliance.**

## **R2 cardiaco**

L'R2 cardiaco [ $R2 = (1/T2^*c) \times 1000$ ] è un altro indice in grado di quantificare il sovraccarico di ferro nel cuore. Diversamente da quanto accade con il T2\* cardiaco, questo varia in misura direttamente proporzionale al sovraccarico di ferro, per cui maggiore è il grado di emosiderosi, maggiore sarà il suo valore (variazioni positive). Considerare l'indice R2 da dei vantaggi in quanto questo parametro tiene conto del fatto che una variazione del T2\* cardiaco ha un peso diverso a seconda del particolare intervallo, espresso in ms, in cui avviene. L'R2 è dunque più adeguato nel confrontare i dati tra gruppi di pazienti in quanto ci permette di modificare il significato dei dati dando più peso alle variazioni di T2\* cardiaco avvenute su valori bassi piuttosto che alle medesime variazioni a valori alti. Questo ci permette di capire perché il miglioramento ad esempio è sensibilmente maggiore in chi è passato da un T2\* cardiaco di 5ms a 6ms piuttosto che da 15ms a 20ms. Valutando l'R2 cardiaco nei nostri pazienti abbiamo ottenuto così dati differenti, più rappresentativi della reale situazione, rispetto a quelli ottenuti con il T2\* cardiaco.

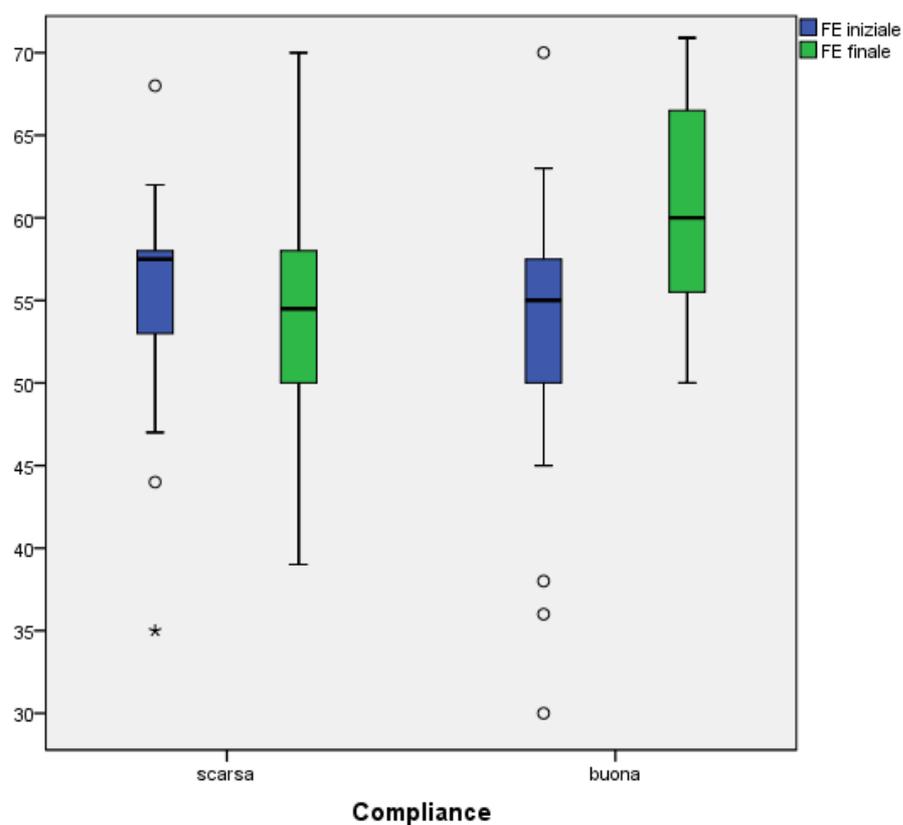
Nel gruppo a buona compliance, l'R2 cardiaco si è ridotto in modo significativo passando da una mediana basale di 129.9 (IQR=36.9) a 79.7 (IQR=51.1) ( $p < 0.001$  Test di Wilcoxon). Diversamente, nel gruppo a scarsa compliance si è registrata un aumento dell'R2, questa volta statisticamente significativo ( $p = 0.025$  Test di Wilcoxon), che è passato da una mediana basale di 119.1 (IQR=33) a 163.9 (IQR=66.9).



**Figura 14: Andamento dell'R2 al tempo zero e dopo il trattamento nei due gruppi a scarsa e buona compliance.**

## Frazione di Eiezione (FE)

Di grande importanza il significativo miglioramento della frazione di eiezione (Fig 15) che è passata da 55% (IQR=8) a 62% (IQR=11) nel gruppo a buona compliance ( $p<0.001$ ). Nel gruppo a scarsa compliance invece si è documentata una riduzione non significativa della FE che è passata da 58% (IQR=5) a 55% (IQR=8) ( $p=0.979$  test di Wilcoxon).



**Figura 15: Andamento della frazione di eiezione al tempo zero e dopo il trattamento nei due gruppi a scarsa e buona compliance.**

## T2\* epatico

Complessivamente non ci sono stati cambiamenti significativi del T2\* epatico (Fig 16) che è passato da 5.2 ms (IQR=4.9) a 6.7 ms (IQR=10.5) nel gruppo a buona compliance (p=0.372 test di Wilcoxon) e da 3.8 ms (IQR=3.5) a 2.4 ms (IQR=3) nel gruppo a scarsa compliance (p=0.649 test di Wilcoxon).

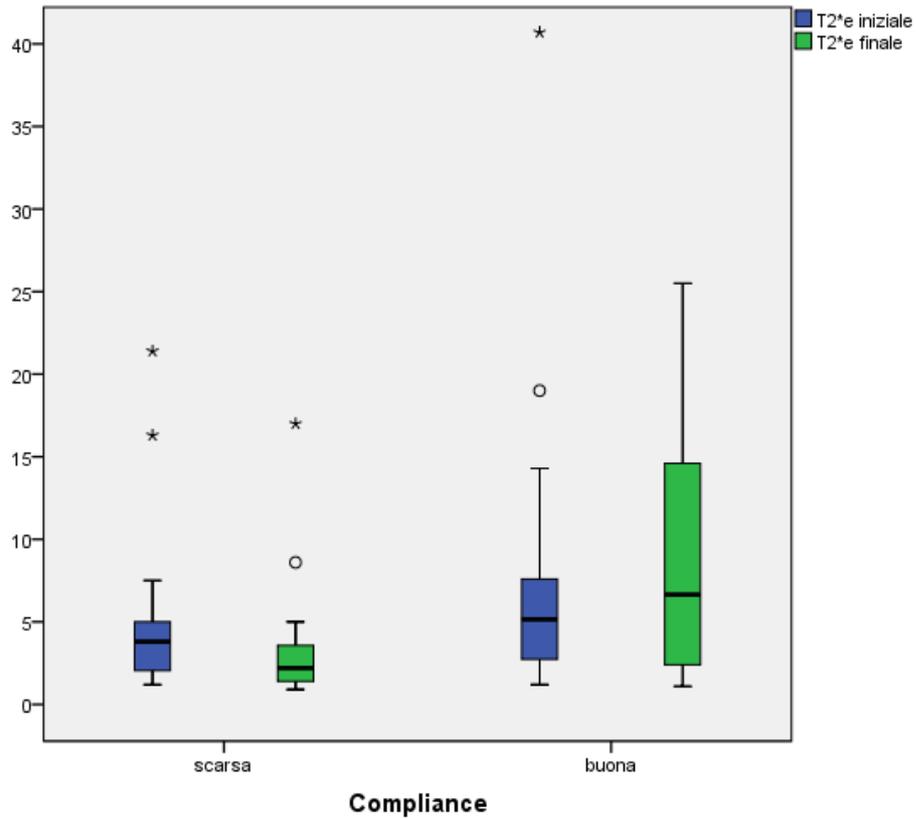
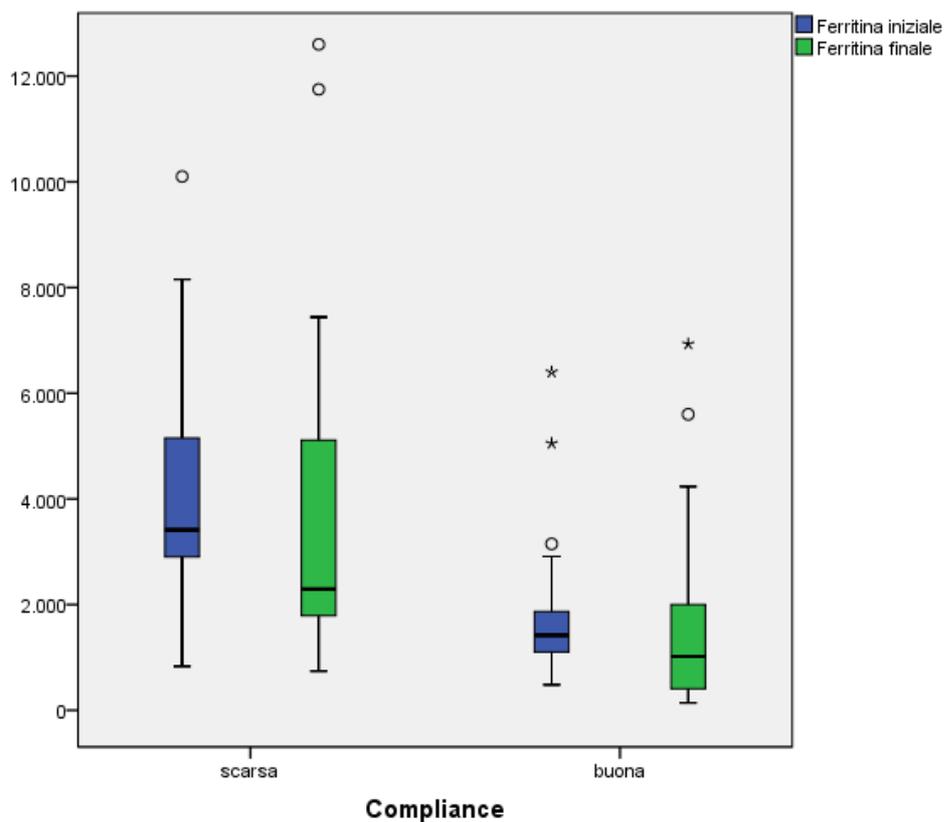


Figura 16: Variazione del T2\* epatico al tempo zero e dopo il trattamento nei gruppi a scarsa e buona compliance.

## Ferritina

La ferritina si è ridotta in entrambi i gruppi, passando da un valore di 1360  $\mu\text{gr/l}$  (IQR=780) a 1020  $\mu\text{gr/l}$  (IQR=1595) ( $p=0.166$  test di Wilcoxon) nei pazienti con buona compliance, e da 3415  $\mu\text{gr/l}$  (IQR=2250) a 2295  $\mu\text{gr/l}$  (IQR=3320) nel gruppo a scarsa compliance ( $p=0.102$  test di Wilcoxon). La differenza non è tuttavia statisticamente significativa (Fig 17).



**Figura 17:** Andamento della ferritina al tempo zero e dopo il trattamento nei due gruppi a scarsa e buona compliance .

## **Confronto tra gruppi di compliance**

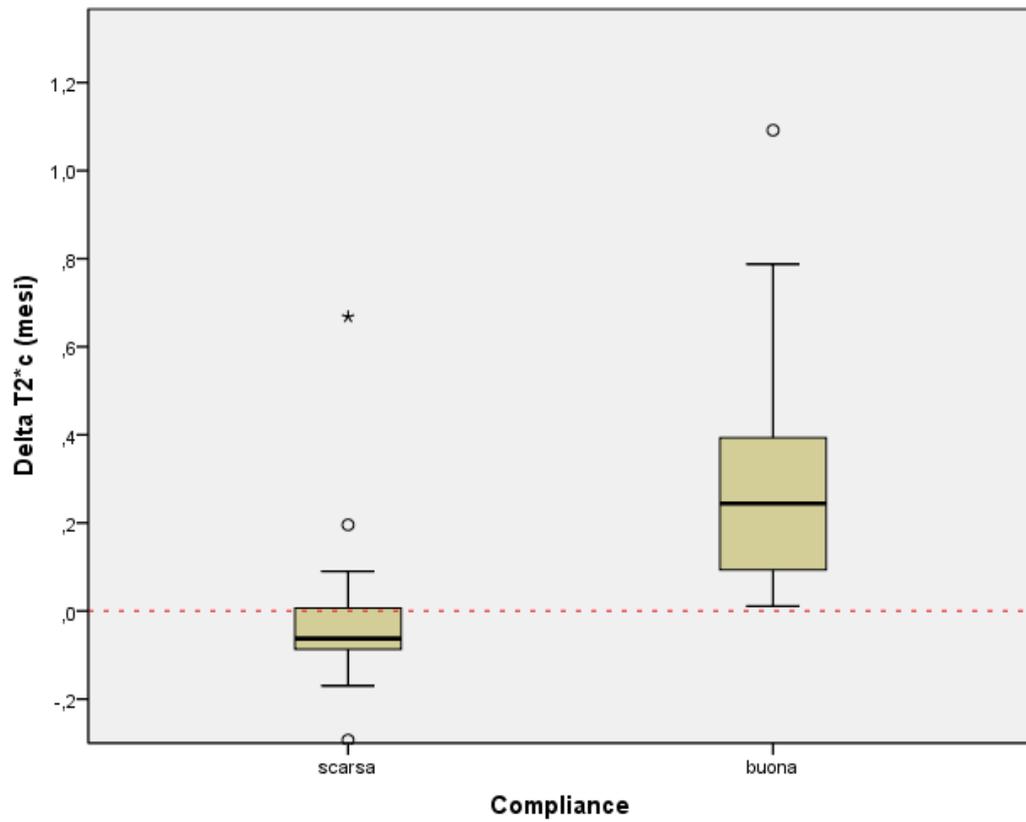
Una volta esaminate le variazioni per indici (T2\*c, R2, FE, T2\*e, ferritina) osservate all'interno di ciascun gruppo dopo un periodo di trattamento con combinato, abbiamo confrontato i gruppi tra loro.

Per ogni parametro è stato calcolato il Delta che corrisponde alla variazione registrata per un dato indice, tra la fine e l'inizio del trattamento, diviso il periodo di tempo in cui è stata fatta la terapia combinata [Delta = (finale – iniziale)/mesi]. Questo calcolo si è reso necessario per poter confrontare i valori, tenuto conto che non tutti i pazienti sono stati rivalutati dopo lo stesso identico intervallo di tempo.

### **Delta T2\* cardiaco (mesi)**

Se confrontiamo la variazione del T2\*cardiaco per mese [Delta T2\*c (mese)] nei due gruppi, si può osservare come ci sia stata una riduzione del T2\* cardiaco, che equivale a un sovraccarico di ferro, nella maggior parte dei pazienti appartenenti al gruppo a scarsa compliance con una mediana di -0.06 ms/mese (IQR=0.1), mentre un aumento del T2\* cardiaco (riduzione dell'emosiderosi) con una mediana di 0.24 ms/mese (IQR=0.3) si è registrato in tutti i pazienti del gruppo a buona compliance (Fig 18).

La differenza dei risultati tra i due gruppi è statisticamente significativa ( $p < 0,001$  Mann-Withney U-test).

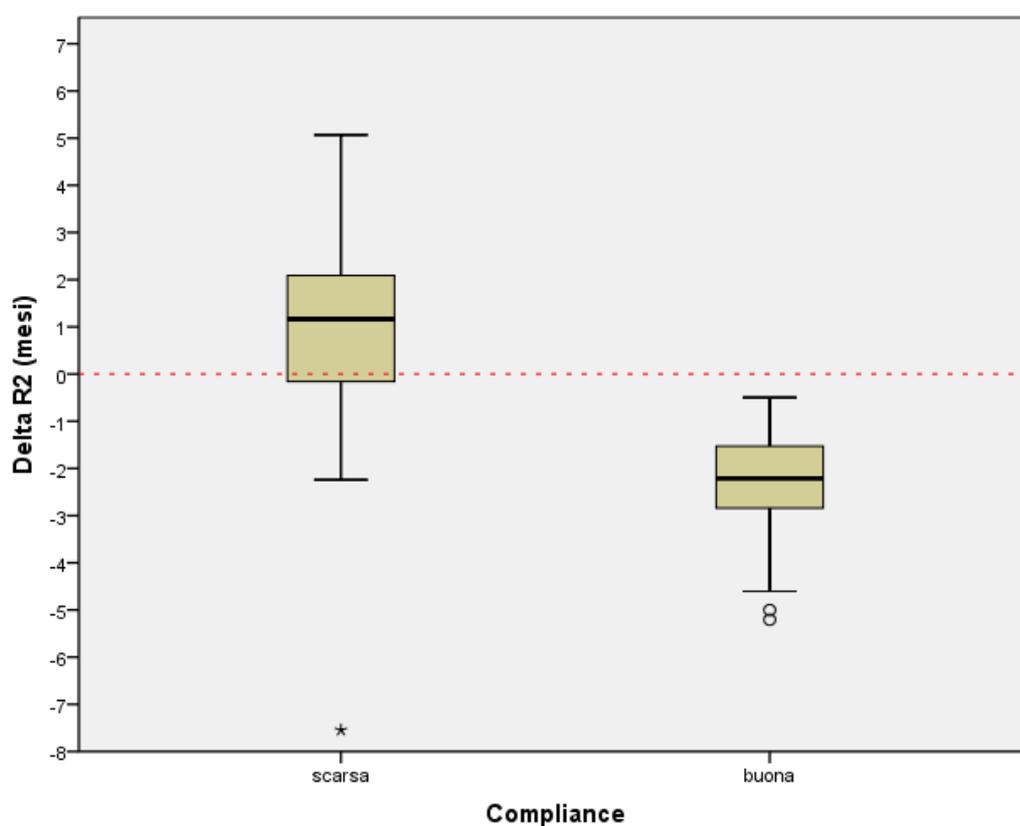


**Figura 18: Confronto tra il Delta T2\*c/mese rispettivamente tra i gruppi a scarsa compliance e a buona compliance.**

## Delta R2 (mesi)

Confrontando la variazione dell'R2 per mese [Delta R2 (mese)] nei due gruppi invece, si nota come ci sia stata una variazione positiva, ossia peggioramento dell'emosiderosi intracardiaco, nel gruppo a scarsa compliance con una mediana di 1.16 (IQR=2.3), e viceversa una variazione negativa del Delta R2, con una mediana di -2.21 (IQR=1.3), in tutti i pazienti del gruppo a buona compliance (Fig.19).

La differenza dei risultati tra i due gruppi è statisticamente significativa ( $p < 0,001$  Mann-Whitney U-test).

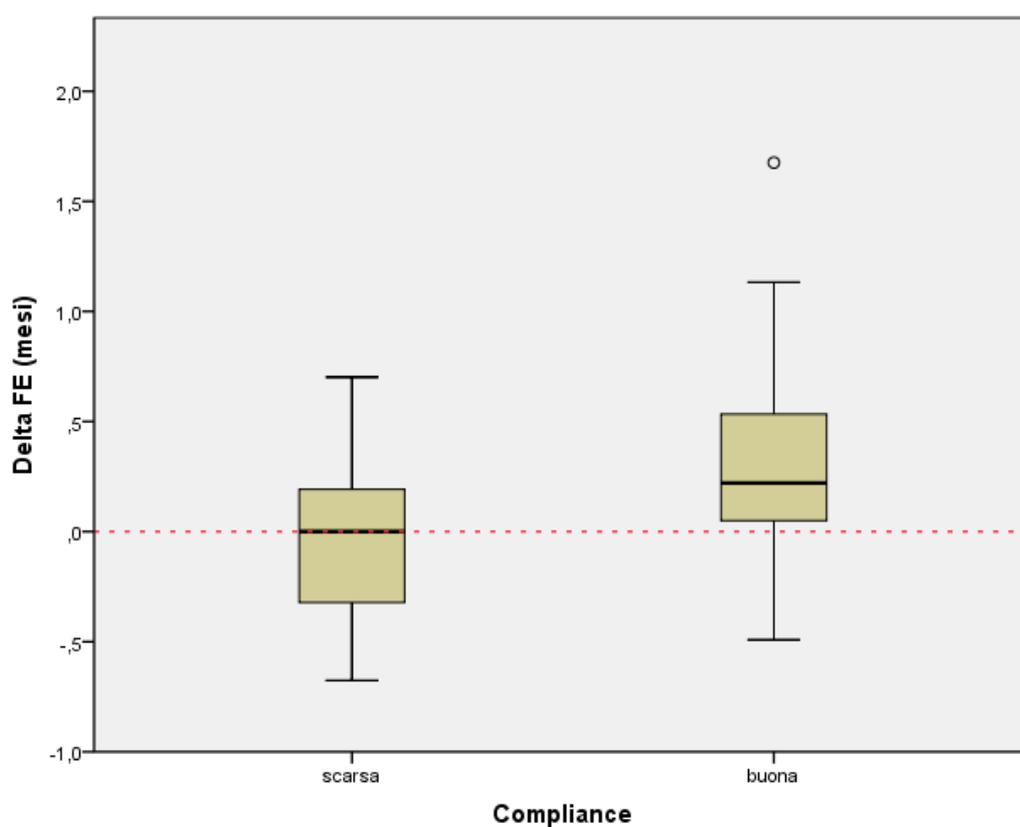


**Figura 19: Confronto tra il Delta R2/mese rispettivamente tra i gruppi a scarsa compliance e a buona compliance.**

## Delta FE (mesi)

Nessuna riduzione della FE per mese si riscontra nel gruppo a scarsa compliance con una mediana dello 0% (IQR=0.5), mentre incrementi della FE 0.22% (IQR=0.5) per mese, si osservano nella maggior parte dei pazienti del gruppo a buona compliance (Fig 20).

La differenza dei risultati tra i due gruppi è statisticamente significativa ( $p < 0,001$  Mann-Whitney U-test).



**Figura 20: Confronto tra il Delta FE/mese rispettivamente tra i gruppi a scarsa compliance e a buona compliance.**

## Delta T2\*epatico (mesi)

Confrontando il Delta T2\* epatico per mese [Delta T2\*e (mese)] nei due gruppi non è emersa alcuna variazione nella maggior parte dei pazienti di entrambi i gruppi. Una variazione mediana di 0.01 ms/mese (IQR=0.2) nel gruppo a scarsa compliance e di 0.06 ms/mese (IQR=0.5) nel gruppo a buona compliance (Fig.21).

La differenza dei risultati tra i due gruppi non è statisticamente significativa.  $p=0,13$  (Mann-Withney U-test).

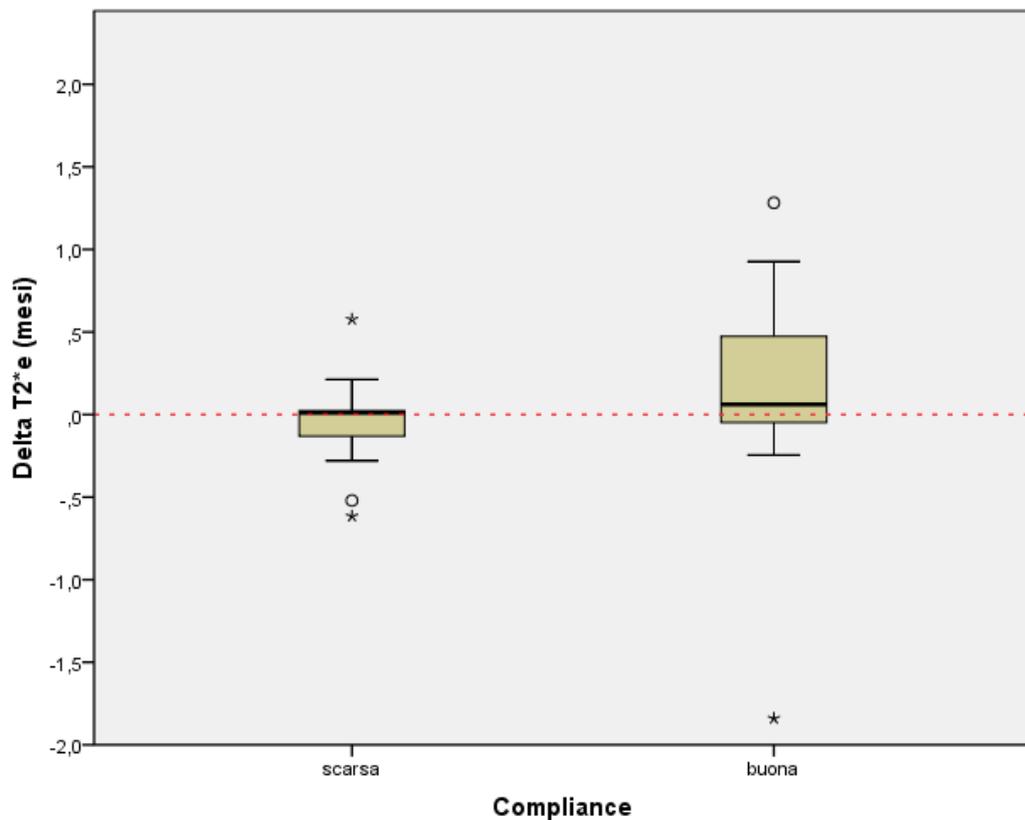


Figura 21: Confronto tra il Delta T2\*/mese rispettivamente tra i gruppi a scarsa compliance e a buona compliance.

## Delta ferritina (mesi)

In entrambi i gruppi si è osservata una riduzione della ferritina per mese con valori di 33.6  $\mu\text{gr/l}$  /mese (IQR=68) nel gruppo a scarsa compliance e 27 $\mu\text{gr/l}$ /mese (IQR=57.6) in quello a buona compliance (Fig 22).

La differenza dei risultati tra i gruppi non è però statisticamente significativa ( $p=0,69$  Mann-Whitney U-test).

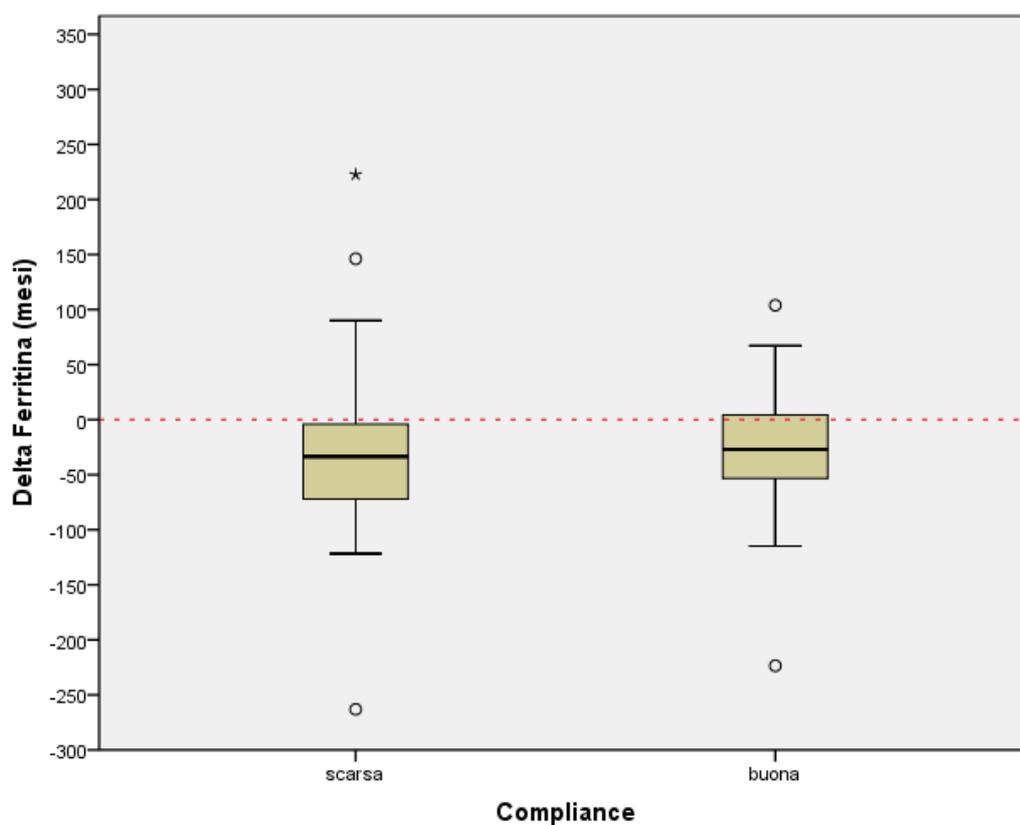


Figura 22: Confronto tra il Delta Ferritina/mese rispettivamente tra i gruppi a scarsa compliance e a buona compliance.

## **Effetti collaterali**

I farmaci ferrochelanti possono essere responsabili di effetti collaterali in seguito al loro utilizzo.

La *desferrioxamina* può determinare reazioni avverse locali, legate ad una ipersensibilità individuale che determina eritema in corrispondenza del sito di infusione e problemi di tossicità a carico di diversi distretti (cataratta, sordità neurosensoriale, displasia scheletrica) in chi ha assunto il farmaco ad alte dosi (>50mg/kg)<sup>79,80,81</sup>.

I principali effetti collaterali del *deferiprone* sono l'artropatia (5-30%) la neutropenia (3-10%), l'agranulocitosi (0,5-2%), sintomi gastrointestinali (nausea, epigastralgia). Talvolta ci può essere un incremento transitorio delle transaminasi (5-20%)<sup>82</sup>.

Nei pazienti da noi esaminati non ci sono stati episodi di neutropenia o agranulocitosi. L'effetto avverso più comunemente riportato in entrambi i gruppi era rappresentato da sintomi gastro-intestinali di lieve entità. C'è stato un caso di lieve artralgia transitoria per la quale non è stato necessario interrompere la terapia e solo in un caso, dopo incremento transitorio delle ALT, è stata ridotta la dose di deferiprone a 50mg/kg/die. Entrambi i pazienti si trovavano nel gruppo a buona compliance.

## **Sopravvivenza**

Nel gruppo a scarsa compliance 3 pazienti sono deceduti per cardiopatia (due per scompenso cardiaco e uno per aritmia fatale) mentre nessuno decesso è avvenuto nel gruppo a buona compliance.

## DISCUSSIONE

I pazienti con talassemia major accumulano ferro nel loro organismo come conseguenza delle continue trasfusioni di sangue cui vengono sottoposti. A lungo andare ciò determina danni perlopiù a carico di fegato, ghiandole endocrine e cuore. La ridotta compliance alla terapia ferrochelante convenzionale (DFO) è considerata un fattore di rischio maggiore nella ricorrenza delle complicanze.

L'insufficienza cardiaca secondaria a sovraccarico di ferro intracardiaco rimane ancora la causa di morte più importante nei pazienti con talassemia major<sup>12</sup>. È ben noto che la disfunzione del ventricolo sinistro e l'insufficienza cardiaca sintomatica ricorrono in uno stadio avanzato della siderosi del miocardio e siano associate a cattiva prognosi anche quando una terapia chelante intensiva venga iniziata tempestivamente<sup>83,84</sup>. Alcuni lavori suggeriscono che una terapia intensiva con desferrioxamina somministrata continuativamente per via endovenosa sia efficace nel risolvere la cardiopatia in molti, ma non in tutti i casi<sup>31,67</sup>. Questo trattamento è ancora considerato il gold standard per numerosi centri in Italia e nel mondo. Un grande passo avanti nella gestione del paziente talassemico e delle sue complicanze si è fatto con l'introduzione di nuovi farmaci ferrochelanti assumibili per os più confortevoli delle lunghe infusioni parenterali necessarie con la desferrioxamina. Questi si sono mostrati efficaci nel rimuovere il ferro in eccesso nella maggior parte dei pazienti. Ma non in tutti. Chi ha un più grave sovraccarico di ferro infatti, non è in grado di rispondere in maniera adeguata ai chelanti assunti in monoterapia. Da qui l'idea di Wonke et al. del 1998 di provare ad associare tra loro i farmaci ferrochelanti: desferrioxamina e deferiprone<sup>74</sup>. L'uso combinato di due chelanti presenta una serie di vantaggi che includono una migliore efficacia, accessibilità a diversi pool di ferro chelatabili, migliore tollerabilità, migliore compliance e migliore aggredibilità del pool di ferro libero NTBI. Su questo stesso principio recentemente si è provato ad associare tra loro la desferrioxamina con il più nuovo deferasirox<sup>85,86</sup>.

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'efficacia e la sicurezza della terapia ferrochelante combinata (deferiprone + desferrioxamina) in una coorte di pazienti con grave siderosi del miocardio ( $T2^*$ cardiaco < 10ms). Nella nostra

casistica l'adesione alla terapia combinata non è stata omogenea per cui si è reso necessario dividere i pazienti in due gruppi a seconda della compliance alla trattamento. La terapia in chi l'ha praticata con una buona compliance, è risultata essere in grado di ridurre il sovraccarico di ferro intracardiaco nei pazienti che non avevano avuto una risposta soddisfacente al deferiprone o alla desferrioxamina in monoterapia.

In un precedente lavoro è stata valutata la distribuzione del T2\* cardiaco in 305 pazienti con talassemia major in differenti regimi di chelazione: monoterapia con deferasirox, deferiprone, desferrioxamina; terapia combinata o alternata con desferrioxamina e deferiprone. I valori ottenuti confermano l'alta prevalenza di siderosi del miocardio moderato-grave riportata da altri centri<sup>87</sup>.

Si riconferma che i diversi chelanti utilizzati non sono stati sempre in grado di fornire un'adeguata protezione sul cuore<sup>36,68</sup>.

Una spiegazione a questo fatto può essere fornita dalla scarsa compliance alla terapia oppure dalla ridotta efficacia dei chelanti, talvolta prescritti in dosi inadeguate in rapporto al ferro introdotto.

La disponibilità di una nuova tecnica di risonanza magnetica cardiaca che misura il T2\*, ha recentemente fatto luce sulla debole relazione esistente tra ferritina/ferro epatico e siderosi del miocardio, consentendo una valutazione diretta dei depositi di ferro nel cuore. Questa acquisizione ha modificato l'idea secondo la quale la sopravvivenza senza malattia cardiaca era buona allorché i livelli di ferritina serica e di ferro epatico restavano al di sotto di 2500 µg/l e 15mg/gr di peso secco rispettivamente<sup>29,88</sup>. Nei pazienti del nostro studio il 15.5% presentava una grave siderosi del miocardio al T2\*cardiaco, ma sarebbero stati considerati a bassissimo rischio di complicanze cardiovascolari sulla base della sola ferritina serica (<1000 µgr/l) misurata nella stessa occasione e risultata in quel momento accettabile.

Emerge chiaramente che un solo valore di ferritina non è in grado di predire i depositi di ferro nell'organismo ma soprattutto quanto importante sia la storia della chelazione propria di ogni paziente. L'effetto di prolungati periodi di cattiva compliance alla terapia ferro-chelante, che si traducono in valori di ferritina

costantemente elevati nel passato, si può avere anche a distanza di anni dal raggiungimento di concentrazioni di ferritina ottimali.

Viene dunque riconfermato il valore del T2\* come strumento diagnostico insostituibile nella gestione del paziente talassemico.

Nel nostro studio abbiamo voluto inoltre valutare l'efficacia e la sicurezza del trattamento combinato in 44 pazienti con grave siderosi del miocardio (T2\*<10ms). Vista la differente adesione al trattamento emersa nel corso dell'osservazione, si è tuttavia reso necessario suddividere i pazienti in due sottogruppi: a buona e a scarsa compliance.

Una buona compliance al trattamento ferrochelante è infatti fondamentale per il raggiungimento di buoni risultati clinici. I pazienti che non assumono continuativamente, e secondo le modalità consigliate, la terapia prescritta hanno una prognosi peggiore di chi invece la assume regolarmente. La scarsa compliance al trattamento, riscontrata frequentemente nei pazienti talassemici, ha un'origine multifattoriale ed è legata solo in parte alle multiple e/o poco confortevoli somministrazioni di farmaci cui si devono sottoporre nell'arco della giornata. L'ostacolo più grande è rappresentato dalla scarsa consapevolezza che i pazienti hanno circa la necessità del trattamento chelante prescritto. I farmaci ferrochelanti vengono infatti somministrati per trattare una complicanza, l'emosiderosi, del tutto asintomatica fino a quando il sovraccarico di ferro è tale da indurre disfunzione acuta d'organo, in primis insufficienza cardiaca, tale da richiedere l'ospedalizzazione urgente<sup>89,90</sup>.

La compliance al trattamento nella nostra coorte è stata giudicata sulla base delle informazioni raccolte nei diari clinici e dall'interrogazione diretta del paziente. Si è deciso di definire buona la compliance di chi ha assunto più del 70% della terapia prescritta e scarsa di chi al contrario ne ha assunto meno del 70%.

La terapia con deferiprone in associazione alla desferrioxamina nei pazienti con buona compliance ha portato ad una riduzione significativa del sovraccarico di ferro intracardiaco [T2\* cardiaco da 7.7 ms (IQR=2.2) a 12.55 ms (IQR=8.7) e indice R2 che è sceso da 129.87 (IQR=36.89) a 79.68 (IQR=51.13), entrambi con un p<0.001] e ad un miglioramento della funzione ventricolare sinistra [frazione di eiezione da 55% (IQR=8) a 62% (IQR=11), p<0.001] in accordo con studi

precedenti<sup>66,67,75</sup>. La grande variabilità interindividuale del T2\* cardiaco rilevato dopo il periodo di trattamento con terapia combinata nel gruppo a scarsa compliance, può essere spiegata con una variabilità elevata dell'adesione al trattamento che cambiava da soggetto a soggetto. Diversamente da altri lavori<sup>75</sup> non è stata riscontrata una variazione statisticamente significativa del valore di T2\* epatico [da 5.15 ms (IQR=4.86) a 6.65 ms (IQR=10.5), p=0.372].

La terapia combinata non ha portato una significativa riduzione dei valori di ferritina serica come invece era stato già precedentemente riportato<sup>74,91,92</sup>.

L'effetto di un tale trattamento è stato dunque quello di interferire maggiormente con la componente di ferro libero piuttosto che sul ferro di deposito (ferritina e ferro intraepatico). Questo ha permesso una riduzione della quota responsabile in massima parte della tossicità cardiaca, l'NTBI, consentendo un miglioramento della funzionalità contrattile (aumento della frazione di eiezione). Inoltre la riduzione della ferritina in pazienti con una cattiva compliance al trattamento, variazione da noi riportata come non significativa, non riflette la tendenza verso un ulteriore accumulo di ferro in organi come il cuore.

Nel gruppo a scarsa compliance invece si è avuto un aumento statisticamente significativo del valore di R2 (p=0.025 Test di Wilcoxon), che è passato da una mediana basale di 119.06 (IQR=32.97) a 163.93 (IQR=66.88). Questo indice, come già esposto in precedenza, presenta dei vantaggi in quanto tiene conto del fatto che variazioni del T2\* cardiaco hanno un peso diverso a seconda del particolare intervallo, espresso in ms, cui avvengono e ci permette così di poter confrontare fra loro i dati ottenuti nei vari pazienti.

Da segnalare inoltre la diversa incidenza di decessi per cardiopatia registrata nei due gruppi: 3 pazienti deceduti nel gruppo a scarsa compliance (due per scompenso cardiaco e uno per aritmia fatale) contro nessuno in quello a buona compliance.

A conclusione del lavoro abbiamo confrontato la variazione dei quattro parametri per mese (delta/mese) tra i due gruppi. Questo lavoro di analisi statistica si è reso necessario per rendere confrontabili tra loro i risultati dei due gruppi. I diversi indici rilevati dopo il periodo di trattamento con terapia combinata non è stato

possibile infatti ottenerli, in tutti i pazienti dello studio, dopo il medesimo intervallo di tempo.

Il praticare una terapia ferrochelante combinata con desferrioxamina e deferiprone ha permesso un miglioramento significativo del grado di sovraccarico di ferro intracardiaco per mese (Delta T2\* cardiaco 0.24ms/mese) nella maggior parte dei pazienti che si sottoponeva al trattamento con una buona compliance. Anche l'R2 cardiaco si è ridotto di 2.21 e la FE è aumentata dello 0.22% per mese.

L'efficacia della terapia chelante può dipendere non solo dal fatto che due farmaci sono meglio di uno ma anche dall'effetto cardioprotettore proprio del deferiprone<sup>40,93</sup>.

I risultati ottenuti con l'aggiunta del deferiprone al regime ferrochelante convenzionale hanno consentito dunque di ridurre la dose totale di desferrioxamina settimanale, così come la frequenza delle infusioni, senza compromettere l'efficacia complessiva della terapia chelante. Questo fatto porta numerosi vantaggi in quanto capace di migliorare la compliance globale al trattamento nella maggior parte dei pazienti e di ridurre notevolmente gli effetti collaterali concentrazione-dipendente associati a ciascun farmaco.

L'incidenza di effetti avversi nella popolazione in studio è stata bassa come quella presentata in precedenti lavori<sup>74</sup> e non è stato necessario interrompere la somministrazione di deferiprone per la comparsa di agranulocitosi. Solo in un caso, dopo incremento transitorio delle ALT è stata ridotta la dose di deferiprone a 50mg/kg/die.

La gestione della siderosi grave del miocardio con la terapia combinata è migliore, forse, della terapia intensiva continua con desferrioxamina endovena per diversi motivi.

E' sicuramente più semplice ed accettata meglio dai pazienti. Presenta meno effetti collaterali rispetto a quelli associati ad una chelazione intensiva con DFO mediante l'utilizzo di un sistema di rilascio intravenoso impiantato (ad es. Port-a-cath) per l'infusione continua a domicilio. Questo presidio permetteva ai pazienti di essere trattati in regime ambulatoriale per diversi mesi o anni. Tuttavia l'impianto di un catetere venoso centrale è alquanto costoso e necessita di una

attenta e puntuale manutenzione da parte di personale competente in modo da ridurre al minimo le complicanze infettive e trombotiche<sup>94</sup>.

Uno svantaggio connesso all'utilizzo del deferiprone è sicuramente legato alla necessità di controlli frequenti dell'emocromo, settimanali, indispensabili per monitorare il numero di neutrofili. L'agranulocitosi rappresenta infatti un'indicazione chiara alla sospensione della terapia.

## CONCLUSIONI

La chelazione con i farmaci normalmente utilizzati nella pratica clinica non proteggono adeguatamente i pazienti con talassemia major dalla cardiopatia ferro-indotta.

La valutazione della ferritina serica e della quantità di ferro intraepatico non sono affidabili nel predire il grado di siderosi del miocardio.

La disponibilità della risonanza magnetica cardiaca consente oggi di valutare il grado di sovraccarico di ferro nel cuore permettendo così di identificare precocemente i pazienti con grave siderosi del miocardio ancora asintomatici, che si gioverebbero di un trattamento chelante intensivo.

Il deferiprone associato alla desferrioxamina (terapia combinata) è utile nel ridurre l'incidenza di complicanze cardiovascolari specialmente in pazienti con  $T2^* < 10\text{ms}$  quando questa viene praticata con una buona compliance.

La terapia combinata è in grado di ridurre il grado di siderosi del miocardio parallelamente ad un miglioramento della funzione ventricolare sinistra.

## BIBLIOGRAFIA

1. Weatherall DJ, *Survival Anemia as a World Health Problem*. In: Oxford Textbook of Medicine. Oxford University Press 1996; 22: 3463-82
2. Linee Guida TIF 2000
3. Porter JB. *Practical management of iron overload*. Br J Haematol 2001;115: 239-252
4. Hershko C. *Pathogenesis and management of iron toxicity in thalassemia*. Ann N Y Acad Sci. 2010 Aug;1202:1-9
5. Anderson LJ, Holden S, Davis B, et al. *Cardiovascular T2-star magnetic resonance for the early diagnosis of myocardial iron overload*. Eur Heart J 2001; 22:2171-2179
6. Sephton-Smith R. *Iron excretion in thalassaemia major after administration of chelating agents*. BMJ 1962; 2: 1577-80
7. Pippard MJ, Letsky EA, Callender ST, Weatherall DJ. *Prevention of iron loading in transfusion-dependent thalassaemia*. Lancet. 1978;1:1178-81
8. Hussain MA, Green N, Flynn DM, Hoffbrand AV. *Effect of dose, time, and ascorbate on iron excretion after subcutaneous desferrioxamine*. Lancet 1977; 1: 977-979
9. Hershko C, Weatherall DJ. *Iron-chelating therapy*. Crit. Rev.Clin. Lab. Sci. 1988; 26:3039-345
10. Finch CA, Deubelbeiss K, Cook JD et al. *Ferrokinetics in man*. Medicine (Baltimore). 1970; 49: 17-53
11. Gabutti V, Piga A. *Results of long-term iron-chelating therapy*. Acta Haematol. 1996;95(1):26-36. Review
12. Borgna-Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD, Del Vecchio GC, Romeo MA, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Piga A, Cnaan A. *Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine*. Haematologica. 2004 Oct;89(10):1187-93
13. Cunningham MJ, Macklin EA, Neufeld EJ, Cohen AR; Thalassemia Clinical Research Network. *Complications of beta-thalassemia major in North America*. Blood. 2004 Jul 1;104(1):34-9. Epub 2004 Feb 26

14. Aessopos A, Kati M, Farmakis D. *Heart disease in thalassemia intermedia: a review of the underlying pathophysiology*. Haematologica. 2007 May;92(5):658-6
15. Kremastinos DT, Tiniakos G, Theodorakis GN, Katritsis DG, Toutouzas PK. *Myocarditis in beta-thalassemia major. A cause of heart failure*. Circulation 1995; 91: 66-71
16. Oudit GY, Sun H, Trivieri MG, Koch SE, Dawood F, Ackerley C, Yazdanpanah M, Wilson GJ, Schwartz A, Liu PP, Backx PH. *L-type Ca<sup>2+</sup> channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy*. Nat Med. 2003 Sep;9(9):1187-94. Epub 2003 Aug 24
17. Oudit GY, Trivieri MG, Khaper N, Liu PP, Backx PH. *Role of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in iron transport and iron-overload cardiomyopathy*. J Mol Med. 2006 May;84(5):349-64. Epub 2006 Apr 8. Review
18. Lesnefsky EJ. *Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury*. Adv Exp Med Biol 1994; 366: 129-46
19. Wood JC, Enriquez C, Chugre N, Otto-Duessel M, Aguilar M, Nelson MD, Moats R, Coates TD. *Physiology and pathophysiology of iron cardiomyopathy in thalassemia*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005; 1054: 386-95
20. Hershko C, Link G, Cabantchik I. *Pathophysiology of iron overload*. Ann NY Acad Sci 1998; 850: 191-201
21. Davis BA, O'Sullivan C, Jarritt PH, Porter JB. *Value of sequential monitoring of left ventricular ejection fraction in the management of thalassemia major*. Blood. 2004 Jul 1;104(1):263-9
22. Westwood MA, Anderson LJ, Maceira AM, Shah FT, Prescott E, Porter JB, Wonke B, Walker JM, Pennel DJ. *Normalized left ventricular volumes and function in thalassemia major patients with normal myocardial iron*. J Magn Reson Imaging 2007 ;25(6):1147-51
23. Telfer PT, Prestcott E, Golden S, Walker M, Hoffbrand AV, Wonke B. *Hepatic iron concentration combined with long-term monitoring of serum ferritin to predict complications of iron overload in thalassemia major*. Br. J Haematol 2000; 110: 971-7
24. Kolnagou A, Economides C, Eracleous E, Kontoghiorghes GJ. *Low serum ferritin levels are misleading for detecting cardiac iron overload and increase the risk of cardiomyopathy in thalassemia patients. The importance of cardiac iron overload monitoring using magnetic resonance imaging T2 and T2\**. Hemoglobin. 2006;30(2):219-27

25. Overmoyer BA, McLaren CE, Brittenham GM. *Uniformity of liver density and nonheme (storage) iron distribution*. Archives Pathol Lab Med 1987; 111: 549-54
26. Angelucci E, Brittenham GM, McLaren CE, Ripalti M, Baronciani D, Giardini C, Galimberti M, Polchi P, Lucarelli G. *Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major*. N Engl J Med. 2000 Aug 3;343(5):327-31
27. Sheth S, Tang H, Jensen JH, Altmann K, Prakash A, Printz BF, Hordof AJ, Tosti CL, Azabagic A, Swaminathan S, Brown TR, Olivieri NF, Brittenham GM. *Methods for noninvasive measurement of tissue iron in Cooley's anemia*. Ann N Y Acad Sci. 2005;1054:358-72
28. Fischer R, Piga A, Harmatz P, Nielsen P. *Monitoring long-term efficacy of iron chelation treatment with biomagnetic liver susceptometry*. Ann N Y Acad Sci. 2005;1054:350-7
29. Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH, Wayne AS, Liu PP, McGee A, Martin M, Koren G, Cohen AR. *Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia*. N Engl J Med. 1994 Sep 1;331(9):574-8
30. Olivieri NF, Brittenham GM, Matsui D et al. *Iron-chelation therapy with oral deferiprone in patients with thalassemia major*. N Engl J Med 1995; 332: 918-22
31. Davis BA, Porter JB. *Long-term outcome of continuous 24-hour deferoxamine infusion via indwelling intravenous catheters in high-risk beta-thalassemia* Blood. 2000 Feb 15;95(4):1229-36
32. Porter JB, Faherty A, Stallibrass L, Brookman L, Hassan I, Howes C. *A trial to investigate the relationship between DFO pharmacokinetics and metabolism and DFO-related toxicity*. Ann N Y Acad Sci. 1998 Jun 30;850:483-7
33. Kyriakou K, Michailides Y, Senkus R et al. *Ultrastructural pathology of the heart in patients with beta-thalassemia major*. Ultrastruct Pathol. 2000; 24: 75-81
34. Hoffbrand AV, Cohen A, Hershko C. *Role of deferiprone in chelation therapy for transfusional iron overload*. Blood. 2003; 102: 17-24
35. Cohen A, Galanello R, Piga A, Di Palma A, Vullo C, Tricta F. *Safety profile of the oral iron chelator deferiprone: a multicenter study*. Br. J Haematology. 2000; 108: 305-312
36. Anderson L, Wonke B, Prescott E, Holden S, Walker J M, Pennel D J. *Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous*

- desferrioxamina on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia.* Lancet 2002; 360: 516-20
37. Olivieri NF, Brittenham GM, McLaren CE et al. *Long-term safety and effectiveness of iron-chelation therapy with defेरiprone for thalassaemia major.* N Engl J Med 1998; 339:417-23
  38. Olivieri NF. *Progression of iron overload in sickle cell .* Semin Hematol. 2001; 38: 57-62
  39. Piga A, Gaglioti C, Fogliacco E, Tricta F. *Comparative effect of defेरiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassaemia major: a retrospective analysis.* Haematologica 2003; 88: 489-96
  40. Borgna-Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL, Gamberini MR, Ghilardi R, Piga A, Romeo MA, Zhao H, Cnaan A. *Cardiac morbidity and mortality in deferoxamine- or defेरiprone-treated patients with thalassaemia major..* Blood 2006;107(9):3733-7
  41. Porter JB, Abeysinghe RD, Hoyes KP et al. *Contrasting interspecies efficacy and toxicology of 1,2-diethyl-3-hydroxypyridin-4-one, CP94, relates to different metabolism of the iron chelating site.* Br. J. Hematology. 1993; 85: 516-520
  42. Hoyes KP, Porter JB. *Subcellular distribution of desferrioxamina and hydroxypyridin-4-one chelators in K562 cells affect chelation of intracellular iron pools.* Br. J. Haematol. 1993; 85:393-400
  43. Porter JB. *Deferasirox--current knowledge and future challenges.* Ann N Y Acad Sci. 2010 Aug;1202:87-93
  44. Chang HH, Lu MY, Liao YM, Lin PC, Yang YL, Lin DT, Chiou SS, Jou ST, Lin KH, Chang TT. *Improved efficacy and tolerability of oral deferasirox by twice-daily dosing for patients with transfusion-dependent  $\beta$ -thalassaemia.* Pediatr Blood Cancer. 2010 Nov 11. [Epub ahead of print]
  45. Galanello R, Piga A, Alberti D, Rouan MC, Bigler H, Séchaud R. *Safety, tolerability, and pharmacokinetics of ICL670, a new orally active iron-chelating agent in patients with transfusion-dependent iron overload due to beta-thalassaemia.* J Clin Pharmacol. 2003 Jun;43(6):565-72
  46. Wood JC, Glynos T, Thompson A, Giardina P, Harmatz P, Kang BP, Paley C, Coates TD. *Follow-up report on the 2-year cardiac data from a deferasirox monotherapy trial.* Am J Hematol. 2010 Oct;85(10):818-9

47. Kontoghiorghes GJ. *Introduction of higher doses of deferasirox: better efficacy but not effective iron removal from the heart and increased risks of serious toxicities*. *Expert Opin Drug Saf*. 2010 Jul;9(4):633-41
48. Pennell DJ, Porter JB, Cappellini MD, El-Beshlawy A, Chan LL, Aydinok Y, et al. *Efficacy of deferasirox in reducing and preventing cardiac iron overload in betathalassemia*. *Blood*. 2010;115(12):2364-71
49. Dudley J, Pennell, John B. Porter, Maria Domenica Cappellini, Lee Lee Chan, Amal El-Beshlawy, Yesim Aydinok, Hishamshah Ibrahim, Chi-Kong Li, Vip Viprakasit, Mohsen Saleh Elalfy, Antonis Kattamis, Gillian Smith, Dany Habr, Gabor Domokos, Bernard Roubert, and Ali Taher. *Continued improvement in myocardial T2\* over 2 years of deferasirox therapy in  $\beta$ -thalassemia major patients with cardiac iron overload*. *Haematologica 2010 (Epub ahead of print)*
50. Cappellini MD, Cohen A, Piga A, Bejaoui M, Perrotta S, Agaoglu L, Aydinok Y, Kattamis A, Kilinc Y, Porter J, Capra M, Galanello R, Fattoum S, Drelichman G, Magnano C, Verissimo M, Athanassiou-Metaxa M, Giardina P, Kourakli-Symeonidis A, Janka-Schaub G, Coates T, Vermynen C, Olivieri N, Thuret I, Opitz H, Ressayre-Djaffer C, Marks P, Alberti D. *A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia*. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3455-62
51. Anderson L, Porter JB, Wonke B, et al. *Cardiac iron deposition is not predicted by conventional markers of iron overload in homozygous beta-thalassaemia*. *Blood* 2000; 96 (suppl I): 606a (abstr)
52. Berdoukas V, Dakin C, Freema A, Fraser I, Aessopos A, Bohane T. *Lack of correlation between iron overload cardiac dysfunction and needle liver biopsy iron concentration*. *Haematologica*. 2005 May;90(5):685-6
53. Porter JB, Shah FT. *Iron overload in thalassemia and related conditions: therapeutic goals and assessment of response to chelation therapies*. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(6):1109-30
54. Hardy PA, Henkelman RM. *Transverse relaxation rate enhancement caused by magnetic particulates*. *Magn Reson Imaging*. 1989 May-Jun;7(3):265-75
55. Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ, Vichinsky E. *Thalassemia*. *Hematology*. Washington, DC: American Society of Hematology 2004:14-34
56. Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ, Vichinsky E. *Thalassemia*. *Hematology*. Washington, DC: American Society of Hematology 2004:14-34

57. Pennell DJ. *T2\* Magnetic Resonance and Myocardial Iron in Talassemia*. Ann N Y Acad Sci. 2005; 1054: 373-853
58. Westwood MA, Sheppard MN, Awogbade M, Ellis G, Stephens AD, Pennell DJ. *Myocardial biopsy and T2\* magnetic resonance in heart failure due to thalassaemia*. Br J Haematol. 2005 Jan;128(1):2
59. Buja LM, Roberts WC. *Iron in the heart. Etiology and clinical significance*. Am J Med. 1971 Aug;51(2):209-21
60. Barosi G, Arbustini E, Gavazzi A, Grasso M, Pucci A. *Myocardial iron grading by endomyocardial biopsy. A clinico-pathologic study on iron overloaded patients*. Eur J Haematol. 1989 Apr;42(4):382-8
61. Westwood MA, Firmin DN, Matta G, Galanello R, Stathis G, Markissia K, Vasili B, Pennell DJ. *Intercentre Reproducibility of Magnetic Resonance T2\* Measurements of Myocardial iron in Thalassaemia*. Int J Cardiovasc Imaging 2005; 21(5):531-8
62. Westwood MA, Anderson LJ, Firmin DN, Gatehouse PD, Lorenz CH, Wonke B, Pennell DJ. *Interscanner reproducibility of cardiovascular magnetic resonance T2\* measurements of tissue iron in thalassaemia*. J Magn Reson Imaging. 2003 Nov;18(5):616-20
63. Tanner MA, He T, Westwood MA, Firmin DN, Pennell DJ; Thalassaemia International Federation Heart T2\* Investigators, *Multi-center validation of the transferability of the magnetic resonance T2\* technique for the quantification of tissue iron*. Haematologica. 2006 Oct;91(10):1388-91
64. Anderson LJ, Westwood MA, Prescott E, Walker JM, Pennell DJ, Wonke B. *Development of Thalassaemic Iron Overload Cardiomyopathy despite Low Liver Iron Levels and Meticulous Compliance to Desferrioxamine*. Acta Haematologica 2006; 115: 106-108
65. Kirk P, Roughton M, Porter JB, Walker JM, Tanner MA, Patel J, Wu D, Taylor J, Westwood MA, Anderson LJ, Pennell DJ. *Cardiac T2\* magnetic resonance for prediction of cardiac complications in thalassaemia major*. Circulation 2009;120(20):1961-8
66. Pennell D, Berdoukas V, Karagiorgia M, et al. *Randomized controlled trial of deferiprone or deferoxamine in beta-thalassaemia major patients with asymptomatic myocardial siderosis*. Blood 2006; 107: 3738-3744
67. Anderson LJ, Westwood MA, Holden S, et al. *Myocardial iron clearance during reversal of siderotic cardiomyopathy with intravenous desferrioxamine: a prospective study using T2\* cardiovascular magnetic resonance*. British J of haematology 2004; 127: 348-355

68. Tanner MA, Galanello R, Dessi C, Westwood MA, Smith GC, Nair SV, Anderson LJ, Walker JM, Pennell DJ. *Myocardial iron loading in patients with thalassemia major on deferoxamine chelation..* J Cardiovasc Magn Reson. 2006; 8(3): 543-7
69. Hershko C, Link G, Pinson A, Peter HH, Dobbin P, Hilder RC. *Iron mobilization from myocardial cells by 3-hydroxypyridin-4-one chelators: studies in rat heart cells in culture.* Blood 1991; 77:2049-53
70. Hershko C, Link G, Konijn AM, Rosenmann E, Reinus C. *The iron-loaded gerbil model revisited: effects of deferoxamine and deferiprone treatment.* J Lab Clin Med 2002; 139:50-58
71. Hershko C, Link G, Konijn AM, Cabantchik ZI. *Objectives and mechanism of iron chelation therapy.* Ann N Y Acad Sci. 2005;1054:124-35. Review
72. Wonke B, Wright C, Hoffbrand AV. *Combined therapy with deferiprone and desferrioxamina.* British Journal of Haematology. 1998; 103: 361-64
73. Alymara V, Bourantas D, Chaidos A, Bouranta P, Gouva M, Vassoi A, Tzouvara E, Bourantas KL. *Effectiveness and safety of combined iron-chelation therapy with deferoxamine and deferiprone.* The Hematology Journal. 2004; 5: 475-479
74. Origa R, Bina P, Agus A, Crobu G, Defraia E, Dessi C, Leoni GB, Muroli PP, Galanello R. *Combined therapy with deferiprone and desferrioxamina in thalassemia major.* Haematologica. 2005; 90(10):1309-1314
75. Tanner MA, Galanello R, Dessi C, Smith GC, Westwood MA, Agus A, Roughton M, Assomull R, Nair SV, Walker JM, Pennell DJ. *A randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Trial of the Effect of Combined Therapy With Deferoxamine and Deferiprone on Myocardial Iron in Thalassemia Major Using Cardiovascular Magnetic Resonance.* Circulation. 2007; 115: 1876-1884
76. Kattamis A, Ladis V, Berdoussi H, Kelekis NL, Alexopoulou E, Papatotiriou I, Drakaki K, Kaloumenou I, Galani A, Kattamis C. *Iron chelation treatment with combined therapy with deferiprone and desferrioxamine: A 12-month trial.* Blood Cells Mol Disease. 2006; 36(1): 21-5
77. Daar S, Pathare AV. *Combined therapy with desferrioxamina and deferiprone in beta thalassemia major patients with transfusional iron overload.* Ann Hematol. 2006; 85: 315-319

78. Grady RW, Berdoukas VA, Rachmilewitz EA et al. *Iron chelation therapy: a better approach*. The 7<sup>th</sup> International Conference on Thalassaemia and the Haemoglobinopathies. Bangkok, Thailand, Maj-June 1999. Abstr.0018
79. Baath JS, Lam WC, Kirby M, Chun A. *Deferoxamine-related ocular toxicity: incidence and outcome in a pediatric population*. *Retina*. 2008 Jun;28(6):894-9
80. Chen SH, Liang DC, Lin HC, Cheng SY, Chen LJ, Liu HC. *Auditory and visual toxicity during deferoxamine therapy in transfusion-dependent patients*. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2005 Dec;27(12):651-3
81. Caruso-Nicoletti M, De Sanctis V, Capra M, Cardinale G, Cuccia L, Di Gregorio F, Filosa A, Galati MC, Lauriola A, Malizia R, Mangiagli A, Massolo F, Mastrangelo C, Meo A, Messina MF, Ponzi G, Raiola G, Ruggiero L, Tamborino G, Saviano A. *Short stature and body proportion in thalassaemia*. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 1998;11 Suppl 3:811-6
82. El Alfy M, Sari TT, Lee CL, Tricta F, El-Beshlawy A. *The safety, tolerability, and efficacy of a liquid formulation of deferiprone in young children with transfusional iron overload*. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010 Nov;32(8):601-5
83. Jessup M, Manno CS, *Diagnosis and management of iron-induced heart disease in Cooley's anemia*. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Jun 30; 850:242-50
84. Hahalis G, Alexopoulos D, Kremastinos DT, Zoumbos NC. *Heart failure in beta-thalassemia syndromes: a decade of progress*. *Am J Med*. 2005 Sep;118(9):957-67
85. Otto-Duessel M, Brewer C, Gonzalez I, Nick H, Wood JC. *Safety and efficacy of combined chelation therapy with deferasirox and deferoxamine in a gerbil model of iron overload*. *Acta Haematol* 2008;120(2):123-8
86. Lal A, Sweeters N, Herz M, Foote D, Neumayr L, Kurio G, et al. *Safety of combined chelation therapy with deferasirox and deferoxamine in transfusion dependent thalassemia*. *Blood*. 2009;114(22):abst 2021
87. Los Angeles, Londra, Torino (dati non pubblicati)
88. Olivieri NF, Brittenham GM. *Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia* *Blood*. 1997 Feb 1;89(3):739-61
89. Osterberg L, Blaschke T. *Adherence to medication*. *N Engl J Med*. 2005 Aug 4; 353(5): 487-97. Review

90. Kidson-Gerber G, Lindeman R. *Adherence to desferrioxamine and deferiprone and the impact of deferiprone co-prescription in thalassaemia major patients. Does the addition of deferiprone improve adherence?* Br J Haematol. 2008 Aug. 142(4): 679-80
91. Mourad FH, Hoffbrand AV, Sheikh-Taha M, Koussa S, Khoriaty AI, Taher A. *Comparison between desferrioxamine and combined therapy with desferrioxamine and deferiprone in iron overloaded thalassaemia patients.* Br J Haematol. 2003 Apr;121(1):187-9
92. Athanassiou-Metaxa M, Kousi A, Hatzipantelis ES, Tsatra I, Ikononou M, Perifanis V, Tsantali H. *Combined chelation therapy with deferiprone and desferrioxamine in iron overloaded beta-thalassaemia patients.* Haematologica. 2004 Apr;89(4):ELT07
93. Piga A, Gaglioti C, Fogliacco E, Tricta F. *Comparative effect of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassaemia major: a retrospective analysis.* Haematologica 2003; 88: 489-96
94. Kim HJ, Yun J, Kim HJ, Kim KH, Kim SH, Lee SC, Bae SB, Kim CK, Lee NS, Lee KT, Park SK, Won JH, Park HS, Hong DS. *Safety and effectiveness of central venous catheterization in patients with cancer: prospective observational study.* J Korean Med Sci. 2010 Dec;25(12):1748-53