

# Fisiopatologia del metabolismo del ferro

Capitolo

50

■ 50.1 Il ruolo del ferro e l'importanza della regolazione dei suoi livelli	1011	■ 50.4 Le carenze di ferro: meccanismi patogenetici e conseguenze	1014
■ 50.2 Una breve descrizione dell'omeostasi sistemica del ferro nell'uomo	1012	■ 50.5 Il sovraccarico di ferro: meccanismi patogenetici e conseguenze	1015
■ 50.3 Il metabolismo intracellulare del ferro	1014		

G. Cairo, S. Recalcati

## 50.1 Il ruolo del ferro e l'importanza della regolazione dei suoi livelli

Il ferro è un elemento essenziale per le più elementari funzioni di ogni organismo, dai procarioti all'uomo. L'importanza del ruolo del ferro in biologia riflette la sua versatilità chimica, cioè la sua capacità di cambiare valenza. Questa caratteristica è stata sapientemente sfruttata dalla natura utilizzando il ferro in un'ampia serie di processi biologici fondamentali.

Esso serve infatti come cofattore per molti enzimi (vedi Tab. 50.1), sia inserito in gruppi eme che sotto altre forme, ad esempio complessato con lo zolfo.

Inoltre, il ferro si ritrova anche nel sito attivo di emoproteine implicate in un vasto spettro di funzioni biologiche cruciali, tra cui il trasporto e l'utilizzo dell'ossigeno.

Quando milioni di anni fa l'atmosfera terrestre è a poco a poco diventata ossidante, il ferro, nonostante la sua estrema abbondanza, ha incominciato ad essere poco disponibile. Infatti, a pH fisiologico e in condizioni ossidanti, il ferro è estremamente insolubile. L'importanza funzionale del ferro, accoppiata con la sua scarsa biodisponibilità, ha obbligato quindi gli organismi viventi ad evolvere da un lato sistemi di riciclaggio del metallo, dall'altro proteine che lo tenevano in soluzione ma che, al contempo, evitassero la sua potenziale pericolosità.

Infatti, il ferro, se non complessato, facilmente catalizza la trasformazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) quali l'anione superossido e l'acqua ossigenata,

che si formano durante la normale attività metabolica della cellula, in radicali ossidrilici ben più reattivi e pericolosi (Fig. 50.1).

Nei vertebrati il ferro è legato in sede extra-cellulare dalla **trasferrina**, che complessa il ferro in circolo nella forma  $Fe^{3+}$  e lo distribuisce ai vari tessuti.

Una volta che il ferro è entrato nella cellula mediante l'internalizzazione della transferrina da parte del recettore della transferrina, la **ferritina** trasforma il metallo, nel frattempo ridotto a  $Fe^{2+}$  altamente reattivo (vedi paragrafo 50.3), nel meno tossico  $Fe^{3+}$  e lo sequestra al suo interno.

La ferritina rappresenta quindi da un lato la sede di deposito del metallo all'interno dei tessuti, ma può anche essere annoverata a pieno titolo tra le proteine coinvolte nella difesa antiossidante. In generale, il controllo dei livelli e della disponibilità di ferro è quindi un elemento cruciale delle difese antiossidanti.

Il metabolismo del ferro tocca molti aspetti della biologia e della medicina: ad esempio, la sintesi proteica, la crescita cellulare, i meccanismi di difesa corporei, i processi degenerativi. Di conseguenza, il sovraccarico di ferro è stato indicato come fattore di rischio per processi patologici di grande importanza quali il cancro, la malattia di Alzheimer, le epatopatie, l'infarto del miocardio.

D'altro lato, bisogna sottolineare che l'anemia da carenza di ferro colpisce oltre il 10% della popolazione mondiale, con notevoli ripercussioni sulla capacità di sviluppo, di apprendimento, di lavoro, di procreazione.

TAB. 50.1 Esempi di proteine ferro dipendenti coinvolte in funzioni essenziali.

Proteine	Funzioni
Emoglobina Mioglobina	Trasporto dell'ossigeno
Ferrochelatasi	Sintesi dell'eme
Proteine della catena respiratoria mitocondriale (citocromi e proteine Fe-S) Enzimi del ciclo di Krebs (aconitasi)	Produzione di energia
Monoamina ossidasi Tirosina idrossilasi	Neurotrasmissione
Citocromi P450 Xantina deidrogenasi/ossidasi Catalasi	Detossificazione, controllo redox
DNA primasi DNA elicasi	Replicazione e riparo degli acidi nucleici
Enzimi del metabolismo dell'acido arachidonico Ossido nitrico sintasi	Risposta infiammatoria
Ribonucleotide riduttasi	Crescita cellulare
Protil idrossilasi e lisil idrossilasi del collagene, "Purple acid" fosfatasi Fosfatasi tartrato resistente (Fe III)	Deposizione/rimodellamento matrice extracellulare e osso
Protil idrossilasi Asparagina idrossilasi	Risposta all'ipossia
Guanilato ciclasi solubile	Vie di segnale/secondi messaggeri

Ne deriva la necessità di mantenere un "giusto" livello di ferro nell'organismo. In questo ambito, va ricordato che anche i microrganismi sono avidi utilizzatori di ferro e hanno evoluto meccanismi molto sofisticati per procurarselo (*vedi* Cap. 7). Mantenere bassi i livelli del ferro disponibile ha quindi un significato difensivo importante non solo perché previene lo stress ossidativo, ma anche come efficace meccanismo batteriostatico (*vedi* paragrafo 50.4).

Ciò pone dei dilemmi specialmente al medico che opera in paesi dove gran parte della popolazione è esposta di continuo ad infezioni batteriche, virali e parassitarie.

La necessità di fornire ferro supplementare (direttamente come farmaco o tramite l'aggiunta di sali di ferro al cibo) per prevenire l'anemia e favorire lo sviluppo cognitivo dei bambini contrasta con numerosi studi che

hanno dimostrato come la supplementazione faciliti ad esempio la replicazione del virus HIV e favorisca i patogeni responsabili della tubercolosi, della malaria, ecc.

## 50.2 Una breve descrizione dell'omeostasi sistemica del ferro nell'uomo

La figura 50.2 riporta uno schema del "traffico" del ferro nel corpo umano. Il ferro viene trasportato in circolo dalla transferrina che lo riceve principalmente dal duodeno e dalle cellule del sistema reticoloendoteliale e lo cede soprattutto alle cellule del midollo osseo, che usano il ferro per proliferare e per sintetizzare emoglobina (*vedi* Riquadro 50.1). Anche tutte le altre cellule sono però in grado di accettare ferro transferrinico e di utilizzarlo per la sintesi di proteine essenziali per la loro vita (es. per la respirazione) e per la loro moltiplicazione (es. per la sintesi del DNA).

Le cellule reticoloendoteliali (soprattutto macrofagi della milza e cellule di Kupffer) distruggono i globuli rossi ormai vecchi o danneggiati e rimettono in circolo il ferro. Questo meccanismo di riciclaggio rappresenta circa l'80% del turnover giornaliero del metallo.

La restante quota proviene dalla dieta ed è assorbita a livello duodenale attraverso un meccanismo altamente controllato che risponde principalmente a variazioni nei depositi corporei e alle richieste delle cellule eritropoietiche (*vedi* Riquadri 50.1 e 50.3).

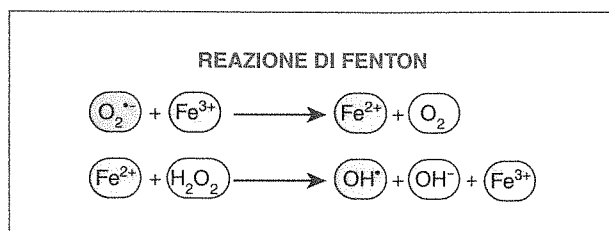


FIG. 50.1 Ferro e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Il superossido non è un ossidante molto potente, ma può facilmente donare il suo elettrone al  $\text{Fe}^{3+}$ , riducendolo a  $\text{Fe}^{2+}$ . In presenza di quest'ultimo, il perossido d'idrogeno produce il radicale idrossile, il più reattivo dei radicali liberi ed il più potente agente ossidante biologico conosciuto.

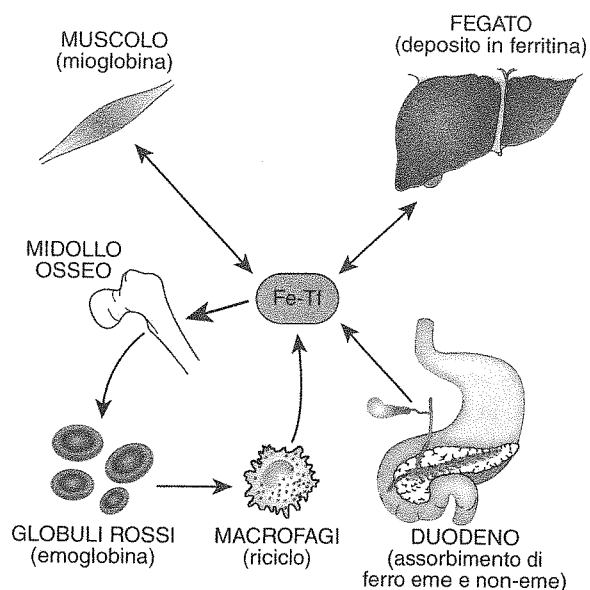
**Riquadro 50.1****Ferro, eme ed eritropoiesi**

Il contenuto corporeo di ferro è circa 55 mg/Kg di peso nell'uomo e 45 mg/Kg nella donna. La maggior parte del ferro nell'organismo umano si ritrova nei globuli rossi (vedi Fig. 50.2). Il nostro corpo contiene circa  $3 \times 10^{13}$  globuli rossi, prodotti alla impressionante velocità di  $100 \times 10^6/\text{min}$  o  $200 \times 10^9/\text{giorno}$  (circa 1% del totale viene rinnovato quotidianamente).

Ogni globulo rosso contiene 200-300  $\times 10^6$  molecole di emoglobina (Hb), per un totale di 1 Kg di Hb; poiché ogni giorno bisogna produrre 6 gr di Hb, servono 20 mg di ferro, ottenuti principalmente dal riciclaggio del ferro attraverso l'emocateresi (vedi Fig. 50.2). Queste elevate quantità possono ulteriormente aumentare per fronteggiare situazioni fisio-patologiche caratterizzate da ipossia tissutale associate a condizioni che interferiscono con l'assunzione o il trasporto di ossigeno (ipossia da alta quota, sindromi cardiache o polmonari, anemia, emorragie). Il ruolo centrale del ferro è stato evidenziato da studi che hanno dimostrato come la contemporanea somministrazione di ferro ottimizza il trattamento con eritropoietina in pazienti affetti da anemia associata a nefropatie. Come accennato in precedenza, è ben noto che un qualsiasi stimolo eritropoietico inibisce la sintesi di epcidina, ma il segnale che le cellule eritropoietiche inviano al fegato per comunicare le proprie necessità non è stato per il momento identificato con certezza. Comunque, in presenza di minori livelli di epcidina, la ferroportina degli enterociti e dei macrofagi esporta attivamente ferro e ciò aumenta la disponibilità di ferro circolante (saturazione della transferrina) soddisfacendo così le richieste eritropoietiche. Infatti, i precursori eritroidi ottengono ferro grazie ad una elevata espressione del recettore della transferrina a partire dallo stadio di colony forming unit eritroidi (CFU-E), prima quindi che inizi la sintesi di Hb. Bisogna inoltre ricordare che il ferro negli eritroblasti non serve solo per produrre Hb, ma è anche necessario per sostenere l'elevata proliferazione di queste cellule.

Il ferro-eme, oltre ad essere un costituente essenziale di una Hb funzionale, regola la sintesi di Hb coordinando la disponibilità delle varie componenti (globine, anello porfirinico, ferro) che devono essere presenti in modo equilibrato. Infatti, l'eme regola la trascrizione dei geni della globina inducendo l'attività del fattore nucleare NF-E2. Inoltre, l'eme favorisce la sintesi proteica (e quindi la traduzione dei mRNA per le catene

globiniche che sono abbondantissimi e preponderanti nei reticolociti). Infatti, l'eme impedisce l'attività di HRI (heme-regulated inhibitor), una chinasi che inattiva il fattore traduzionale eIF-2. La necessità di mantenere i corretti livelli delle tre componenti che andranno a costituire l'emoglobina è dimostrata anche dal fatto che la mancanza della proteina FLVCR1, che espelle l'eccesso di eme, blocca lo sviluppo dei progenitori eritroidi, probabilmente a causa della tossicità dell'eme. A sua volta, la disponibilità di ferro regola tramite le IRP (vedi Riquadro 50.2) l'espressione dell'aminolevulinato sintasi eritroide (eALAS), il primo degli enzimi necessari per la biosintesi dell'anello porfirinico dell'eme (vedi Cap. 49). Infatti, la carenza di ferro, attivando le IRP che si legano alla sequenza IRE presente nel mRNA dell'eALAS, rallenta o blocca la biosintesi dell'eme.

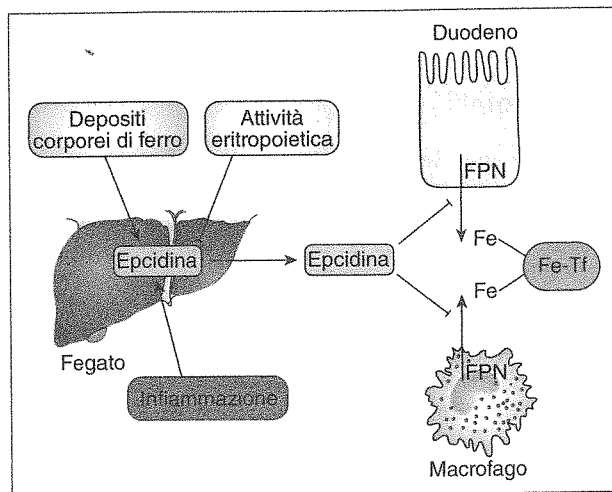


**FIG. 50.2** Metabolismo sistemico del ferro. La transferrina (Tf) lega il ferro assorbito nel duodeno e lo trasporta in circolo cedendolo a tutte le cellule, che possono usarlo per le proprie esigenze o conservarlo. Il maggior utilizzatore è il midollo eritropoietico che inserisce il ferro nell'emoglobina. I macrofagi, dopo aver fagocitato e distrutto i globuli rossi vecchi o danneggiati, rilasciano nuovamente il ferro in circolo.

L'escrezione di ferro è modesta, probabilmente perché il ferro è prezioso, e avviene soltanto per processi passivi quali la desquamazione degli epitelii (cutaneo ed intestinale). Come conseguenza della mancata possibilità di regolare l'escrezione del ferro, un aumento incontrollato dell'apporto di ferro (di origine ereditaria o ambientale) non può venire compensato e porta ine-

vitabilmente all'accumulo di metallo e a gravi patologie d'organo (vedi paragrafo 50.5).

La regolazione sistemica dell'omeostasi del ferro dipende principalmente dall'interazione fra l'**epcidina**, un peptide secreto principalmente dal fegato, e la **ferroportina**, una proteina di membrana che trasporta il ferro fuori dalle cellule (Fig. 50.3).



**FIG. 50.3** L'epidina come regolatore dell'omeostasi sistemica del ferro. Principali segnali che inducono o reprimono la sintesi epatica di epidina ed effetti dell'interazione fra epidina e ferroportina (FPN) nelle cellule bersaglio.

Un eccesso di ferro induce la sintesi di epidina, che a sua volta causa l'internalizzazione e la degradazione della ferroportina, bloccando così il rilascio, soprattutto dalle cellule duodenali e dai macrofagi.

L'epidina, modulando con meccanismo feed-back l'assorbimento ed il riciclaggio del ferro, controlla quindi la concentrazione di ferro nel plasma. Oltre che dal ferro, l'espressione dell'epidina è soprattutto indotta dagli stimoli infiammatori, in modo da limitare il ferro accessibile ai batteri. Da questo punto di vista l'epidina può essere annoverata fra le proteine della fase acuta. Viceversa, la sintesi di epidina è inibita, oltre che dalla carenza di ferro, in condizioni di anemia/ipossia, o comunque quando l'eritropoiesi viene stimolata; questa risposta tende ad aumentare la disponibilità di ferro in circolo per soddisfare le ingenti richieste delle cellule eritropoietiche (Riquadro 50.1).

### Riquadro 50.2

#### Regolazione del metabolismo intracellulare del ferro

La regolazione del metabolismo intracellulare del ferro avviene grazie a due proteine chiamate *iron regulatory proteins* (IRP1 e IRP2) che in risposta a carenza di ferro nel LIP si legano ai mRNA del recettore della transferrina, della ferritina e della ferroportina regolandone la stabilità o la traduzione in proteina. In condizioni di carenza di ferro, IRP1 e IRP2 si legano ad un *iron regulatory element* (IRE) nella regione non tradotta del mRNA della ferritina e della ferroportina bloccando quindi la sintesi di queste proteine. Contemporaneamente, le IRP si legano anche ad IRE del mRNA del recettore della transferrina proteggendolo dalla degradazione e favorendo quindi la sintesi della proteina. Il

### 50.3 Il metabolismo intracellulare del ferro

Il ferro può venire utilizzato dalle cellule grazie alla internalizzazione per endocitosi della transferrina diferrica, che viene legata da uno specifico recettore; dopo il rilascio di ferro all'interno della cellula, transferrina e recettore della transferrina vengono riportati alla superficie cellulare dove la loro unione finisce e la transferrina ritorna in circolo. Nella cellula, il  $Fe^{3+}$  viene ridotto a  $Fe^{2+}$  e trasportato attraverso la membrana della vescicola di endocitosi per essere liberato nel citoplasma dove entra in un pool poco caratterizzato chiamato *labile iron pool* (LIP). In seguito, esso può andare incontro a tre destini:

- essere utilizzato per le necessità metaboliche della cellula, ad esempio nel mitocondrio, grande "consumatore" di ferro;
- essere escreto grazie alla ferroportina;
- essere conservato all'interno della ferritina.

La quantità di ferro nel LIP viene finemente regolata grazie ad un sistema di controllo che agisce a livello post-trascrizionale (vedi Riquadro 50.2).

### 50.4 Le carenze di ferro: meccanismi patogenetici e conseguenze

La **carezza di ferro** colpisce quasi il 25% della popolazione terrestre ed approssimativamente un miliardo di persone sono affette da **anemia sideropenica**, che è la conseguenza più comune della carenza di ferro perché il metallo non è sufficiente per la sintesi di emoglobina e per la proliferazione delle cellule eritroidi.

Vi sono alcune anemie sideropeniche rare causate da difetti genetici che compromettono la sintesi o il funzio-

risultato netto è un aumento della disponibilità di ferro all'interno della cellula.

Quando il ferro intracellulare è abbondante, IRP1 e IRP2 sono inattive e non si legano agli IRE e quindi il mRNA del recettore della transferrina viene degradato, bloccando l'ulteriore ingresso di ferro nella cellula, mentre quello della ferritina e della ferroportina vengono attivamente tradotti per favorire l'esportazione e il sequestro intracellulare del ferro in eccesso. Numerose altre proteine, più o meno strettamente connesse al metabolismo del ferro, sono regolate tramite questo meccanismo, anche se i bersagli principali di IRP1 e IRP2 sembrano essere quelli descritti sopra.

namento di alcune proteine del metabolismo del ferro, ma le principali cause delle anemie da carenza di ferro sono:

- a) aumentato utilizzo di ferro non accompagnato da un adeguato aumento dell'assorbimento, ad es. in gravidanza quando servono da 1 a 6 mg in più al giorno (~1 grammo totale) oppure in fase di crescita;
- b) perdite di ferro fisiologiche (ad es. mestruazioni con le quali si perdono oltre 10 mg dal momento che mediamente il sangue contiene 0,5 mg/ml di ferro) o patologiche: emorragie acute e croniche, in particolare dall'apparato gastrointestinale; infezioni da parassiti gastrointestinali; emolisi intravascolare;
- c) diminuito apporto di ferro protratto nel tempo e dovuto a dieta povera di carne, malassorbimento causato da ipocloridria, gastrite atrofica (il pH acido serve a mantenere il ferro nella forma ridotta più facilmente assimilabile), celiachia con compromissione dell'epitelio duodenale (vedi Riquadro 50.3).

Anche un altro tipo di anemia molto diffusa, l'**anemia della malattia cronica**, che colpisce soprattutto pazienti colpiti da tumore, infiammazioni croniche, infezioni e malattie autoimmuni, è correlata al ferro. Tuttavia, in questo caso non c'è carenza assoluta di ferro, ma alterata distribuzione (e quindi è scarsa o nulla l'efficacia terapeutica della somministrazione di ferro). Infatti, una ritenzione di ferro nelle cellule del sistema reticolo endoteliale anormalmente elevata contribuisce allo sviluppo dell'anemia. Fondamentale in questo caso è il ruolo patogenetico dell'epcidina, che in seguito alla stimolazione da parte delle citochine pro infiammatorie, raggiunge valori plasmatici molto alti e provoca pertanto una diminuzione dell'attività esportatrice della ferroportina, con conseguente riduzione del riciclaggio del ferro da parte dei macrofagi. Il calo dell'assorbimento duodenale dipendente dalla ferroportina contribuisce a diminuire il ferro in circolo e la sua disponibilità per l'eritropoiesi.

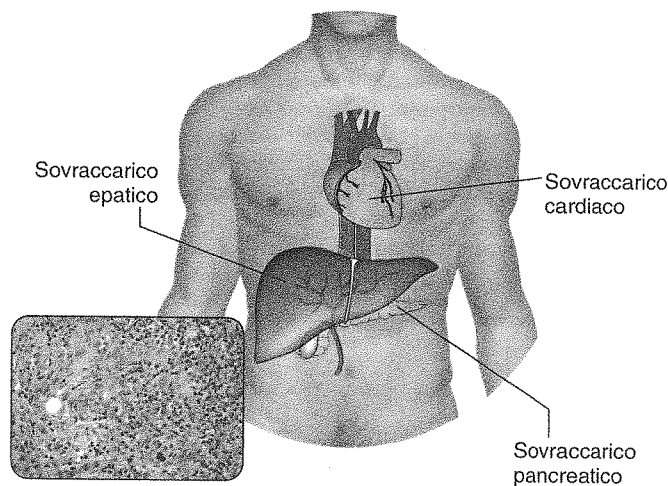
Anche la carenza di ferro spesso riscontrata nell'obesità è probabilmente una conseguenza del latente stato infiammatorio associato a questo tipo di patologia.

Come tutte le anemie, anche quella sideropenica causa debolezza, astenia, affaticamento, in particolare nell'anziano. Oltre al significato clinico, questi sintomi possono avere particolare valore anche dal punto di vista socio-economico in quelle popolazioni che dipendono ancora largamente dal lavoro manuale per il loro

sostentamento. Alcuni recenti studi effettuati in donne con carenza di ferro, ma non anemiche, hanno dimostrato che il trattamento con ferro, ma non con placebo, attenua significativamente i sintomi di affaticamento cronico. Sembra pertanto che in questo ambito il ferro possa avere un effetto indipendente da quello eritropoietico, in accordo con risultati ottenuti parecchi decenni fa sia nell'uomo che in modelli sperimentali animali. Il meccanismo potrebbe essere legato alla necessità di avere ferro a sufficienza da incorporare nelle numerose proteine che richiedono ferro, in particolare in quelle mitocondriali coinvolte nei processi di produzione di energia, e nella mioglobina.

### 50.5 Il sovraccarico di ferro: meccanismi patogenetici e conseguenze

Le sindromi caratterizzate da sovraccarico di ferro (**emocromatosi**) sono eterogenee e possono essere ereditarie o acquisite; sono tutte solitamente caratterizzate da una quantità di ferro in circolo che va oltre le necessità dell'organismo, con elevata saturazione della transferrina (vedi Tab. 50.2). Con il tempo, il ferro si accumula nelle cellule parenchimali di vari organi; particolarmente colpiti sono fegato, cuore e ghiandole endocrine (Fig. 50.4).



**FIG. 50.4** Organi maggiormente colpiti dal sovraccarico di ferro. Il riquadro mostra evidenti depositi di ferro in una sezione epatica di un paziente con emocromatosi colorata con blu di prussia di Perl.

**TAB. 50.2** Valutazione dello stato del ferro per la diagnosi di carenze e sovraccarichi.

	Normale	Carenza	Sovraccarico
Ferritina sierica (ng/ml)	15-200 donne 20-300 uomini	<15 donne <20 uomini	>200 donne >300 uomini
Saturazione transferrina (%)	15-45 donne 20-50 uomini	<15 donne <20 uomini	>45 donne >50 uomini

I test di laboratorio più utilizzati sono la determinazione della ferritina sierica e della saturazione della transferrina.

### Riquadro 50.3

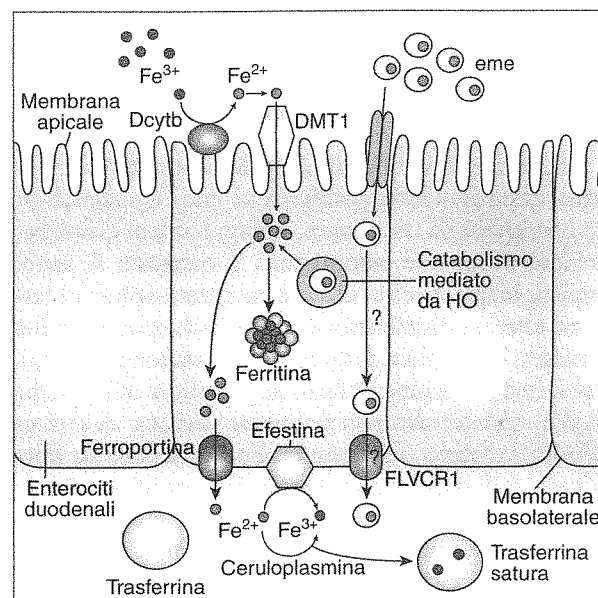
#### Biodisponibilità del ferro e assorbimento intestinale

Negli alimenti il ferro è presente come ferro eme e non-eme ed una dieta giornaliera equilibrata contiene mediamente 10-30 mg di ferro, una quantità ampiamente in grado di soddisfare il fabbisogno (1-2 mg al giorno nell'adulto).

Il ferro eme, che si trova ad esempio nella carne (più nella rossa che nella bianca), è assorbito a livello duodenale attraverso meccanismi non completamente noti, ma con un'efficienza circa 10 volte più alta rispetto al ferro non-eme, al punto che, pur essendo solo un terzo del ferro ingerito, rappresenta i due terzi del ferro assorbito. La scarsa efficienza di assorbimento del ferro non eme (circa 10% della quantità ingerita) è dovuta alla specificità del trasportatore di ferro sulla superficie apicale degli enterociti (DMT1) per la forma  $\text{Fe}^{2+}$  (Fig. 50.5). Nonostante la presenza a livello intestinale di un enzima che riduce il ferro (Dcytb), la facilità di questo metallo ad andare incontro ad ossidazione rende ragione dello scarso assorbimento ed anche dell'effetto benefico della presenza nella dieta di riducenti (es. vitamina C), che facilitano il processo. Viceversa, la presenza di polifenoli e fitati (contenuti in the, caffè, vegetali, fibre) inibisce l'assorbimento del ferro, che viene legato in modo non specifico da questi composti e viene quindi reso non disponibile. Ne consegue che meno del 10% del ferro dei vegetali (che peraltro ne contengono buone quantità) viene assorbito. Il ferro-eme, racchiuso nell'anello porfirinico, è invece più protetto. All'interno della cellula duodenale, il ferro entrato tramite DMT1, o quello derivato dall'eme dopo la scissione operata dall'eme ossigenasi (HO), può essere conservato nella **ferritina** o essere riversato in circolo attraverso la membrana basolaterale grazie all'azione della **ferroportina**. Per il legame con la **trasferrina** plasmatica è necessario che il ferro sia riportato alla forma  $\text{Fe}^{3+}$  da un'ossidasi di membrana (**efestina**) e/o da una circolante (**ceruloplasmina**). Non è ancora completamente provato che il

ferro eme dalla cellula duodenale possa passare direttamente nel sangue grazie all'azione dell'esportatore FLVCR1 (Fig. 50.5). Il passaggio dalla cellula intestinale al circolo attraverso la membrana basolaterale sembra essere il punto di controllo più importante.

Il latte contiene 80-50 microgrammi di ferro per 100 ml, una quantità non elevata, ma in genere sufficiente per le esigenze delle prime fasi di sviluppo, dal momento che i neonati assorbono il ferro molto meglio degli adulti.



**Fig. 50.5** Assorbimento duodenale del ferro. Il trasporto del ferro attraverso le membrane (apicale e basolaterale) dell'enterocita è operato grazie all'azione di ossidasi, riduttasi e trasportatori specifici.

Le conseguenze cliniche sono rappresentate da patologie epatiche (fibrosi che può evolvere a cirrosi ed epatocarcinoma), diabete, cardiomiopatie, artropatie, ipogonadismo e pigmentazione cutanea (nel passato l'emocromatosi è stata anche denominata "diabete bronzi-no"). A livello cellulare, il danno è dovuto principalmente ai meccanismi legati allo stress ossidativo esposti prima.

La maggior parte delle emocromatosi ereditarie è dovuta a mutazioni nel gene **HFE**, che codifica per una proteina della membrana cellulare strutturalmente, ma non funzionalmente, simile alle proteine del sistema HLA, la cui funzione nel metabolismo del ferro non è stata ancora completamente chiarita. Questo tipo di

emocromatosi è molto diffuso (circa 0,3% nella popolazione caucasica), anche se dal punto di vista genetico la penetranza è bassa, cioè solo una parte dei soggetti con mutazione omozigote presenta sintomi da sovraccarico di ferro. Ciò è probabilmente dovuto all'effetto modificatore di polimorfismi in altri geni del metabolismo del ferro ed anche agli effetti non genetici legati all'ambiente (in senso lato). Ad esempio, una dieta povera di ferro può essere protettiva, così come le perdite di sangue nelle donne; viceversa, altri agenti tossici possono portare facilmente alla patologia di organo (ad es. il consumo di alcool facilita l'insorgenza di epatopatie nei soggetti emocromatosici).

La mutazione nel gene HFE pare sia avvenuta in popolazioni celtiche nell'Europa del Nord (diffondendosi poi con i movimenti migratori anche in America ed in Australia) e sia stata conservata nell'evoluzione perché facilita l'accumulo di ferro, un elemento favorevole alla vita (e alla riproduzione) nelle condizioni di scarsità di ferro alimentare che hanno caratterizzato i secoli passati. Inoltre, a differenza di altri tipi di sovraccarico di ferro, l'emocromatosi genetica è caratterizzata da bassi livelli di ferro nei macrofagi. Ciò può avere favorito la resistenza a batteri intracellulari responsabili di gravi epidemie (tifo, tubercolosi) che necessitano grandemente di ferro.

Esistono anche altre emocromatosi genetiche, molto più rare, dovute a mutazioni in altri geni del metabolismo del ferro e caratterizzate da un quadro clinico più grave e spesso da un'insorgenza precoce (emocromatosi giovanile); una caratteristica comune di tutte queste patologie è data dalla mancata regolazione dell'epcidina. La terapia più diffusa dell'emocromatosi genetica è rappresentata dal **salasso**, che è generalmente ben tollerato.

Esistono poi patologie con **sovraccarico di ferro secondario** che sono associate a malattie diverse, quali ad esempio epatopatie e porfiria cutanea tarda, o a rare alterazioni genetiche. Il sovraccarico si trova poi molto spesso in varie malattie ematologiche: talassemie, anemie sideroblastiche congenite con anomalie del metabolismo dell'eme, anemie diseritropoietiche

congenite, sindromi mielodisplastiche ed anemie aplastiche; in questi casi il sovraccarico può anche essere una conseguenza delle frequenti trasfusioni di sangue utilizzate a scopo terapeutico. Tipico ed esemplificativo è il caso delle talassemie: in quella intermedia si ha sovraccarico perché l'anemia che caratterizza questa malattia fornisce un continuo stimolo ad assorbire elevate quantità di ferro, che d'altra parte non può essere utilizzato a causa del difetto nella sintesi della globina (eritropoiesi inefficiente) e finisce quindi per accumularsi nei parenchimi. Dal punto di vista patogenetico, in questa condizione, l'inibizione della produzione di epcidina causata dalla forte anemia appare prevalere sull'attivazione della sintesi di epcidina che dovrebbe essere la risposta fisiologica al sovraccarico di ferro epatico, e quindi l'assorbimento si mantiene elevato. Nel caso delle talassemie più gravi, in aggiunta all'elevato assorbimento, le trasfusioni di sangue, necessarie per contrastare la grave anemia, contribuiscono pesantemente all'accumulo (circa 20 grammi di ferro in 4 anni con una media di 2 trasfusioni al mese) e peggiorano il quadro clinico. Prima dell'introduzione della **terapia chelante** (decennio 1970-1980) i pazienti sottoposti cronicamente a trasfusioni morivano per danno cardiaco da sovraccarico di ferro in giovanissima età. Da allora, e con l'utilizzo di nuovi chelanti del ferro, l'aspettativa di vita è migliorata molto, ma la mortalità continua ad essere piuttosto elevata.

## Riquadro 50.4

### Test e parametri per la diagnosi di carenze e sovraccarichi

La transferrina può essere in forma apo (senza ferro) oppure con uno o due atomi di ferro legati. La **saturatione della transferrina**, cioè la percentuale di siti di legame della proteina effettivamente occupati dal ferro, indica la disponibilità sistemica del ferro.

La determinazione della **ferritina serica** è un importante strumento di valutazione dello status del ferro, in particolare delle riserve: si stima generalmente che una concentrazione di 1 µg/litro equivalga a circa 8 mg di ferro di deposito. Tuttavia, il suo livello è influenzato anche da altre variabili, soprattutto l'infiammazione; pertanto, la sieroferritina è elevata in presenza di patologie quali i tumori, la sindrome metabolica, le epatopatie, le malattie autoimmuni e varie infiammazioni croniche. In queste condizioni, la saturazione della transferrina, che è alta nel sovraccarico di ferro, è solitamente bassa o normale ed è quindi possibile distinguere le diverse patologie. Specifici meccanismi di proteolisi causano il rilascio in cir-

colo di una porzione del recettore della transferrina. Dal momento che l'espressione di questo recettore è particolarmente alta nelle cellule eritroidi, la concentrazione del **recettore solubile della transferrina (sTfR)** è strettamente correlata all'eritropoiesi e alla richiesta di ferro e rappresenta quindi un utile parametro (spesso valutato come rapporto con il logaritmo della concentrazione della siero ferritina nella formula  $sTfR/\log$  ferritina) per diagnosticare la carenza di ferro e per distinguere l'anemia sideropenica da quella della malattia cronica.

Il **dosaggio del ferro** in biopsie epatiche è un metodo sicuramente più accurato per valutare le riserve di ferro, ma è un test invasivo e quindi il suo utilizzo è limitato alla diagnosi dei gravi sovraccarichi. Negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi fisici, ad esempio la **magnetic resonance imaging (MRI)**, come mezzi non invasivi e precisi per valutare l'accumulo di ferro, ma queste metodiche non sono ancora molto diffuse.

# Fisiopatologia degli organi emopoietici e del sangue

## Capitolo

# 60

■ 60.1 Costituenti normali del sangue	1227	■ 60.6 Modificazioni qualitative e quantitative dei leucociti	1271
■ 60.2 Emopoiesi	1229	■ 60.7 Anomalie strutturali dei neutrofili	1273
■ 60.3 Fisiopatologia generale degli eritrociti	1236	■ 60.8 Disordini della funzione dei granulociti	1274
■ 60.4 Anemie	1254	■ 60.9 Trombocitemia essenziale e trombocitopenia	1274
■ 60.5 Policitemie	1270		

V. Sica

## 60.1 Costituenti normali del sangue

Il sangue è formato da differenti tipi di cellule sospese in un mezzo fluido detto *plasma*. La porzione cellulare occupa il 45% circa del volume. Se si lascia coagulare un campione di sangue, la parte liquida, priva del fibrinogeno e delle altre proteine della coagulazione, prende il nome di *siero*. Le cellule possono essere distinte in *eritrociti* o *globuli rossi* e in *leucociti* o *globuli bianchi*. Altri elementi figurati sono costituiti dalle piastrine o trombociti, frammenti cellulari derivanti dai grossi *megacariociti*.

La determinazione del numero totale e percentuale delle cellule ematiche, che costituisce un esame di laboratorio fondamentale in quasi tutte le indagini diagnostiche, è indicata come *esame emocromocitometrico*, o più semplicemente come *emocromo*. Questo, che si esegue attualmente in prima istanza con apparecchiature automatizzate su di un campione di sangue venoso prelevato a digiuno e reso incoagulabile, fornisce, oltre al conteggio delle cellule ematiche e alla determinazione della loro distribuzione percentuale, anche diversi dati riguardanti il contenuto eritrocitario in emoglobina ed altri parametri a cui si farà cenno in questo stesso paragrafo.

Gli eritrociti sono gli elementi più numerosi, con una media che si aggira intorno ai 5.000.000 per microlitro (o mm<sup>3</sup>). Hanno la forma di disco biconcavo con un diametro di circa 7-8  $\mu\text{m}$ . Possiedono una membrana con una struttura proteica ben organizzata e contengono acqua, emoglobina, una varietà di altre proteine, sali e

alcune vitamine. In condizioni normali non possiedono un nucleo, anche se circa l'1% di essi ha un aspetto reticolare (reticolociti) dovuto alla colorazione di residui di ribosomi, mitocondri ed altri organuli citoplasmatici ancora presenti nelle cellule giovani.

Il numero dei leucociti nell'adulto varia da 4.500 a 11.000 per microlitro ( $\mu\text{l}$ ). Essi possono essere suddivisi in *granulociti* o *leucociti polimorfonucleati*, *monociti* e *linfociti*. I granulociti ed i monociti sono fagociti, mentre i linfociti sono coinvolti nei meccanismi immunitari. I granulociti si suddividono in *neutrofili*, *eosinofili* e *basofili* secondo le diverse proprietà tintoriali dei loro granuli citoplasmatici. Ed infatti queste strutture si colorano in rosa violetto nei neutrofili, rosa pallido negli eosinofili, ed in blu scuro o nero nei basofili. Il nucleo dei neutrofili è plurilobato (da 2 a 5 lobi), quello degli altri granulociti è bilobato. La percentuale dei vari tipi di leucociti costituisce la *formula leucocitaria* (Tab. 60.1).

TAB. 60.1 Formula leucocitaria nell'adulto.

	Valori limite (per $\mu\text{l}$ )	Valori medi (per $\mu\text{l}$ )	%
Leucociti totali	4.500-11.000	7.400	100
Granulociti neutrofili	1.800-7.700	4.400	59,5
Granulociti eosinofili	0-450	200	2,7
Granulociti basofili	0-200	40	0,5
Linfociti	1.000-4.800	2.500	33,8
Monociti	0-800	300	4



Le piastrine, che variano, come numero, da 150.000 a 440.000 per  $\mu\text{l}$ , hanno forma di un disco di circa 2-3  $\mu\text{m}$  di diametro con una struttura al microscopio ottico relativamente omogenea.

Quando il caso lo richiede, all'esame emocromocitometrico con sistema automatizzato, si associa lo studio al microscopio dello striscio di sangue, colorato col metodo di May-Grunwald-Giemsa, che fornisce una serie di informazioni molto utili per la diagnosi di molte patologie ematologiche.

Quando il contenuto di emoglobina e la forma degli eritrociti sono normali, il campione esaminato è definito *normocromico* e *normocitico*. Variazioni in più o in meno del contenuto emoglobinico daranno un maggiore o minore grado di colorazione (*ipercromia* o *ipocromia*). Per *policromasia* si intende un grado di colorazione che varia da cellula a cellula.

La patologia degli eritrociti è spesso accompagnata da alterazione della loro morfologia. Quando le modificazioni interessano le dimensioni si parla di *anisocito-*

*si*. Cellule più grandi del normale sono dette *macroцитi*, più piccole *microцитi*. Se è interessata la forma si usa il termine di *poichilocitosi*. Spesso le alterazioni di forma sono più specifiche e caratteristiche di un determinato quadro patologico (Tab. 60.2). In aggiunta a queste modificazioni della forma e delle dimensioni nei globuli rossi possono essere presenti inclusioni di vario tipo (Tab. 60.2). La presenza di nucleo è invece indice di una rigenerazione eritrocitaria molto rapida e che è associata in genere ad una patologia midollare.

Quando un campione di sangue reso incoagulabile è centrifugato, la maggior parte del sedimento è costituita da globuli rossi. Il volume occupato dal sedimento è detto *ematocrito* e varia in media, in condizioni normali, dal 41% nella donna al 46% nell'uomo. Una riduzione del valore *ematocrito* è indice, in generale, di *anemia*; un suo aumento di *policitemia*.

I valori ematologici normali che si riferiscono agli eritrociti sono riportati nella tabella 60.3 insieme ad alcuni indici assoluti di utilità pratica.

**TAB. 60.2** Principali modificazioni morfologiche degli eritrociti e loro significato patologico.

Modificazioni eritrocitarie	Significato patologico
Microцитi (eritrociti di ridotte dimensioni)	Difetto di emoglobinizzazione dovuto di solito a carenza di ferro o ad un difetto di sintesi dell'emoglobina
Macroцитi (eritrociti di aumentate dimensioni)	Alterazione dell'eritropoiesi che può indicare un'eritropoiesi megaloblastica, una emolisi o una displasia midollare
Sferocити (eritrociti sferici che nello striscio appaiono fortemente emoglobinizzati)	Di solito, indicativi di un danno della membrana che può essere la conseguenza di un difetto genetico o un'anomalia dovuta ad un danno da anticorpi
Cellule a bersaglio (eritrociti con un'area centrale colorata)	Deficiente emoglobinizzazione; epatopatie; iposplenismo
Ellissocити (eritrociti di forma ovale od ellittica)	Danno della membrana da difetto genetico
Poichilocити (eritrociti a "lacrima", ad elmetto, forme frammentate, ecc.); schistocити (eritrociti allungati)	Indicano un danno subito nella microcircolazione in caso di microangiopatia. Poichilocitosi di grado variabile si ha nelle anemie megaloblastiche ed in altre patologie dell'eritropoiesi. Gli eritrociti a lacrima sono caratteristici della mielosclerosi
Drepanocити (eritrociti a forma di falce)	Anemia falciforme
Acantocити (eritrociti a forma di foglia di acanto)	Disordini genetici del metabolismo lipidico
Inclusioni: a) granuli di ferro (siderocити) b) corpi di Howell-Jolly ed anelli di Cabot c) corpi di Heinz	Sono presenti dopo splenectomia (residui nucleari, precipitati di emoglobina o di subunità della globina)

**TAB. 60.3** Valori ematologici normali riferiti agli eritrociti.

	Uomo	m	Donna	m
Numero degli eritrociti (in un $\text{mm}^3$ di sangue) $\times 10^9$	4,4-5,9	5,1	3,8-5,2	4,5
Concentrazione dell'emoglobina (g/100 ml di sangue)	13,3-17,7	15,5	11,7-15,7	13,7
Ematocrito	39,8-52,2	46,0	34,9-46,9	40,9
Volume Corpuscolare Medio (MCV) ( $\mu\text{m}^3$ )	80,5-99,7	90,1	80,8-100,0	90,4
Emoglobina Corpuscolare Media (MCH) (pg)	26,6-33,8	30,2	26,4-34,0	30,2
Concentrazione dell'emoglobina corpuscolare media (MCHC) (g/100 ml di globuli rossi)	31,5-36,3	33,9	31,4-35,8	33,6

Il volume corpuscolare medio (MCV = Mean Corpuscular Volume), che dà un'indicazione delle dimensioni degli eritrociti e l'emoglobina corpuscolare media (MCH = Mean Corpuscular Hemoglobin), che ci informa sul contenuto di emoglobina per cellula, si ottengono dividendo rispettivamente l'ematocrito e la concentrazione dell'emoglobina per il numero degli eritrociti. La concentrazione dell'emoglobina corpuscolare media (MCHC = Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) rappresenta la quantità di emoglobina in percento del volume di un globulo rosso. Essa è calcolata col rapporto tra la concentrazione dell'emoglobina e il valore dell'ematocrito. Questi indici sono usati per classificare varie forme di anemia.

I leucociti possono essere anormali nel numero o nella forma. Un aumento del loro numero è detto *leucocitosi*. Se l'aumento coinvolge solo un tipo di leucociti si parlerà, rispettivamente, di *granulocitosi*, *monocitosi* o *linfocitosi*. Per *neutrofilia*, *basofilia* o *eosinofilia* si intende una granulocitosi che interessa in particolare i neutrofili, i basofili, o gli eosinofili. Una riduzione del numero dei granulociti neutrofili prende il nome di *neutropenia*; quella dei linfociti di *linfopenia*. Per *agranulocitosi* si intende l'assenza di granulociti nel sangue.

Per quanto riguarda le piastrine, il loro aumento prende il nome di *trombocitosi* o *piastrinosi*, la loro diminuzione di *trombocitopenia* o *piastrinopenia*.

## 60.2 Emopoiesi

Il primo organo emopoietico è il *sacco vitellino*, nel quale già alla fine della terza settimana di sviluppo le cellule mesodermiche iniziano il loro processo differenziativo formando gli *emoangioblasti* o *angioblasti*, i quali proliferando, formano aggregati cellulari, definiti *isole sanguigne*. In queste, gli angioblasti periferici si differenziano in cellule (endotelioцити e periciti), che provvedono alla *vasculogenesi*, cioè alla formazione della parete dei vasi primitivi, mentre gli angioblasti più interni provvedono alla formazione delle cellule ematiche primitive, rappresentate da emazie embrionali. Questa è la ragione per cui le cellule endoteliali e quelle ematiche esprimono diversi marcatori comuni. L'ulteriore differenziazione dei vasi primitivi in vasi di vario tipo e vario calibro avviene successivamente ed è definita *angiogenesi*.

Gli angioblasti più interni presenti nelle isole sanguigne sono considerati cellule staminali ematopoietiche (Hematopoietic Stem Cells = HSC), perché capaci di autorinnovamento e di potenzialità differenziativa (vedi paragrafi seguenti). Non è stato ancora stabilito se e quando esse migrino nel fegato e nella milza. Difatti, a partire dalla V-VI settimana di sviluppo e fino al sesto mese l'emopoiesi, si svolge soprattutto nel fegato ed in minore proporzione nella milza con formazione di

eritrociti, di megacariociti (da cui derivano le piastrine) di granulociti, di linfociti e di monociti. Molti autori ritengono che all'emopoiesi epatica e a quella splenica provvedano cellule staminali emopoietiche originate da cellule mesodermiche presenti in una regione embrionale, definita AGM (Aorta, Gonade, Mesonefro). L'emopoiesi midollare inizia tra il IV ed il V mese di sviluppo e, a partire dal VI mese, il midollo osseo diventa il principale organo deputato alla funzione emopoietica.

Gli eritrociti derivati dagli angioblasti delle isole sanguigne sono ancora nucleati e contengono emoglobina embrionale, mentre quelle di derivazione epatica e splenica producono emoglobina fetale e anche piccole quantità di emoglobina adulta. Durante i primi anni di vita la componente cellulare emopoietica del midollo osseo diffonde nelle ossa lunghe, nelle costole, nello sterno, nelle ossa del cranio, in quelle del bacino e nelle vertebre. Verso il 4° anno di vita, cellule adipose midollari sostituiscono quelle emopoietiche attive a partire dalle diafisi delle ossa lunghe, cosicché a circa 18 anni solo il midollo delle vertebre, delle costole, delle ossa piatte e delle epifisi prossimali delle ossa lunghe funziona in senso emopoietico.

La tabella 60.4 indica i periodi nei quali i vari organi emopoietici summenzionati svolgono la loro funzione.

### 60.2.1 Composizione cellulare del midollo osseo

Più dell'80% degli elementi cellulari del midollo osseo è rappresentato da cellule della serie granulocitopoietica (54%) ed eritropoietica (26%) nei vari stadi di maturazione. Il resto è formato da elementi linfoidi (17,5%), monociti (0,3%), megacariociti (0,1%), da cellule reticolari e da una piccola aliquota di cellule staminali.

Per delineare un quadro funzionale globale del midollo emopoietico, è necessario considerare alcuni concetti di cinetica cellulare. Il primo è quello di **compartimento**, termine usato dai biologi per definire le cellule che sono in una particolare fase di differenziazione. Per esempio, il compartimento "eritroide" contiene quelle cellule che sono programmate per svilupparsi in eritrociti. In alternativa, alcune popolazioni cellulari possono ancora avere la capacità di differenziarsi in più di una

TAB. 60.4 Organi emopoietici nel corso dello sviluppo.

Vita fetale	Sacco vitellino (dal 19° giorno alla 4 <sup>a</sup> -5 <sup>a</sup> settimana) Fegato e milza (dalla 4 <sup>a</sup> -5 <sup>a</sup> settimana al 6° mese) Midollo osseo (parzialmente dal 4° mese ed essenzialmente dal 6° mese)
Infanzia	Midollo osseo in tutti i suoi distretti
Vita adulta	Midollo osseo delle vertebre, delle costole, delle ossa piatte e delle epifisi prossimali delle ossa lunghe

forma di cellula ematica matura. In questo caso si dirà che esse occupano un compartimento "non determinato" o "uncommitted". Le cellule possono inoltre essere classificate in base al loro particolare stato nell'ambito del ciclo cellulare, a seconda, cioè, se si trovano in fase di sintesi del DNA, in mitosi, fuori dal ciclo, etc. Un parametro di notevole interesse è rappresentato anche dal *tempo di transito compartimentale*, che è il tempo medio trascorso da una cellula mieloide in un certo stadio o compartimento maturativo. Questo tempo varia a seconda della linea differenziativa percorsa. Per es. per quanto riguarda la serie mieloide, si va dalle 23 ore per i mieloblasti alle 84 ore per i metamielociti. Complessivamente si valuta che l'intervallo dallo stadio proeritroblastico all'ultima mitosi policromatofila sia per la serie eritroide da 2 a 5 giorni e che per la serie mieloide tra la formazione del mieloblasto e quella del mielocita occorrono da 3,5 a 9 giorni. Nella figura 60.1 sono riportati i vari compartimenti cellulari in cui viene suddiviso il midollo per la maturazione degli eritrociti e dei granulociti. Come si può notare, tutti i diversi compartimenti, sia proliferativi che di maturazione, sono

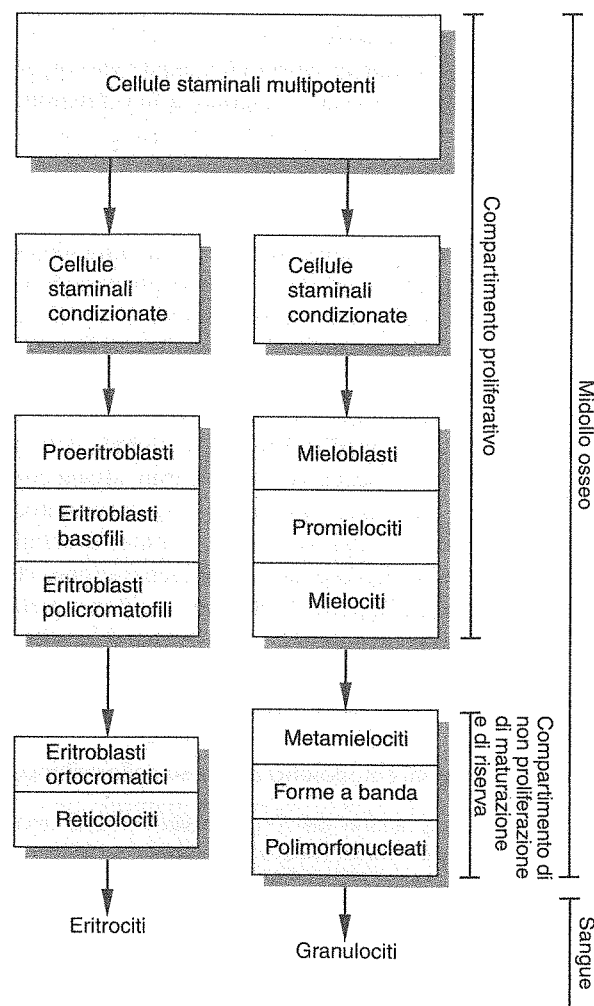


FIG. 60.1 Compartimenti funzionali del midollo.

*compartimenti di transito*, vale a dire che gli elementi che li compongono e che si trovano in un certo stadio evolutivo rapidamente li lasciano per quelli successivi. Questa progressione è caratterizzata dalla diminuzione e poi dalla scomparsa della capacità di dividersi e da un aumento della sintesi e, quindi, della concentrazione delle sostanze che caratterizzano l'elemento terminale maturo. L'unico compartimento che, in condizioni di equilibrio, conserva le sue dimensioni senza l'apporto di elementi esterni al compartimento è quello delle cellule staminali primitive, che sono le uniche in grado di dare origine sia a cellule figlie che hanno le stesse potenzialità funzionali di quelle da cui derivano sia a cellule figlie destinate a differenziarsi.

Una momentanea insufficienza midollare si manifesta in conseguenza:

- di un'aumentata distruzione periferica di leucociti o di eritrociti o
- di un rallentamento dei processi di maturazione midollare e dell'immissione in circolo di cellule ematiche mature provocato dalla carenza di particolari fattori necessari per la normale emopoiesi.

Nell'uno e nell'altro caso intervengono meccanismi omeostatici che porteranno all'iperproduzione dei fattori che regolano l'emopoiesi (ad es. eritropoietina). Si verifica, così, dapprima un aumento del "volume" dei primi compartimenti occupati dai progenitori, che dal compartimento delle cellule staminali si differenziano e passano nei compartimenti successivi e quindi l'espansione dei compartimenti più maturi che provocano un aumento della complessiva produzione midollare di cellule mature. Questa è la condizione di iperplasia midollare più comune, che può interessare una sola serie (*iperplasia midollare parziale*) o tutte le serie cellulari (*iperplasia midollare totale*).

### 60.2.2 Le cellule staminali emopoietiche

Le cellule staminali emopoietiche (*Hemopoietic Stem Cells = HSC*) sono cellule staminali dell'adulto (*Adult Stem Cells = ASC*), cioè cellule staminali indifferenziate, localizzate nel midollo osseo, da dove soltanto una piccola aliquota viene anche versata nel sangue, dal quale, oltre che dal midollo osseo, è anche possibile effettuare l'isolamento. Come tutte le ASC, anche le HSC sono dotate della capacità di autorinnovarsi e di dare origine a cellule differenziate (Riquadro 60.1).

Il compartimento midollare staminale svolge in condizioni normali un doppio compito:

- mantenere costante sia la sua riserva di cellule staminali che la composizione cellulare del sangue e
- adeguare l'emopoiesi alle esigenze dell'organismo tutte le volte che questo richieda un incremento di una determinata popolazione cellulare presente nel sangue circolante.

## Riquadro 60.1

### Le cellule staminali

Si definiscono *cellule staminali* le cellule indifferenziate dell'organismo che nel loro processo replicativo esprimono la capacità di formare due cellule figlie, delle quali una mantiene tutte le caratteristiche della cellula genitrice (proprietà dell'*autorinnovamento*, che comporta l'inesauribilità), mentre l'altra nel suo processo replicativo forma una progenie costituita da uno o più tipi di cellule differenziate (*potenzialità differenziativa*).

Le prime cellule staminali embrionali umane (*Embryonic Stem Cells = ESC*) furono isolate negli ultimi anni del Novecento dagli embrioni alla stadio di blastocisti, ottenuti nelle tecniche di procreazione assistita, prima del loro impianto nell'utero. La *blastocisti* è una vescicola, costituita da circa 150 cellule delle quali una ottantina forma lo strato esterno (*trofoectoderma*), che delimita un'area cavitaria interna ripiena di liquido (*blastocoele*) nella quale è contenuto un gruppo di una cinquantina di cellule che costituiscono la cosiddetta *massa interna*.

In esperimenti eseguiti su topi è stato dimostrato che la più estesa potenzialità differenziativa, definita *totipotenza*, è posseduta soltanto dalla cellula uovo fecondata (zigote) e che essa perdura attraverso lo stadio di morula e quello successivo di blastocisti per il fatto che questa, dopo l'impianto nella mucosa uterina, è in grado di inseguire una gravidanza.

Anche se nel suo insieme la blastocisti esibisce la totipotenza della cellula uovo fecondata, in realtà questa si riduce a *pluripotenza* nelle due strutture cellulari in essa presenti, essendo stato dimostrato che:

- a) dalle cellule della massa interna derivano i tre foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma), dai quali si formeranno quel paio di centinaio di differenti tipi cellulari presenti nell'embrione

- nel corso del suo progressivo sviluppo, mentre
- b) dalle cellule del trofoectoderma derivano soltanto le cellule che costituiranno la placenta e gli altri annessi embrionali.

In altre cellule staminali embrionali la pluripotenza si riduce ulteriormente a *multipotenza*: sono multipotenti, difatti, le cellule staminali in grado di autorinnovarsi e di dare anche origine a cellule con diverso indirizzo differenziativo nel contesto di un ben definito tessuto, quale, per esempio, quello ematico, la cui costituzione è rappresentata dagli eritrociti, dalle cellule della serie bianca e dai megacariociti da cui si formeranno le piastrine. Infine altre cellule staminali subiscono un'ulteriore riduzione della loro potenzialità differenziativa perché dalla loro replicazione si formano cellule di una unica via differenziativa. Questa capacità è definita *unipotenza*.

Col prosieguo delle indagini si scoprì che cellule staminali, dotate cioè delle capacità all'auto-rinnovamento ed alla differenziazione, sono presenti anche nell'adulto (*Adult Stem cells = ASC*) non solo a livello del midollo osseo e degli epitelii, ma anche a livello di un gran numero dei tessuti differenziati. Tra le ASC, quelle che hanno ricevuto la maggiore attenzione da parte dei ricercatori sono le cellule staminali emopoietiche (*Hemopoietic Stem Cells = HSC*), localizzate prevalentemente nel midollo osseo, che sono multipotenti anche se non è stato ancora chiarito se esse derivino o meno da un'altra categoria di cellule staminali adulte, presenti anch'esse nel midollo osseo, definite *Mesenchymal Stem Cells (MSC)* che sono da considerare pluripotenti, perché in grado di autorinnovarsi e di differenziarsi verso tutti i tipi cellulari derivati dai tre foglietti embrionali.

La maggior parte delle HSC si trova nella fase G0 del ciclo cellulare, mentre l'aliquota di esse che ha ricevuto uno stimolo proliferativo imbocca la fase G1 per diventare attivamente ciclante.

Gli stimoli proliferativi che raggiungono le HSC quiescenti sono apportati da fattori di crescita, dei quali una consistente aliquota è sintetizzata e rilasciata da cellule presenti nella nicchia, che costituisce il microambiente che avviluppa ognuna di esse (*vedi oltre*), mentre l'altra aliquota è prodotta da cellule periferiche.

Si tratta di diverse citochine, agenti da fattori di crescita emopoietici, quali IL-1, IL-3 (detta anche Multi Colony Stimulating Factor = Multi CSF), IL-6, FLT3-ligand (Flt-L), trombopoietina, Stem Cell Factor (SCF), la cui azione è potenziata da quella di altri fattori di crescita emopoietici, preferenzialmente attivi su cellule "committed", cioè già indirizzate verso un determinato percorso differenziativo (*vedi par. 60.2.5*). Le suddette citochine risultano preferenzialmente attive come stimolanti la proliferazione non solo delle HSC quiescenti, ma anche delle prime cellule da esse derivate, definite *Pro-*

*genitori comuni emopoietici* o anche *Cellule amplificatrici di transito (Transit Amplifying Cells = TAC)* che mantengono la multipotenza delle HSC.

Le citochine che intervengono nelle ulteriori fasi del processo differenziativo, oltre all'eritropoietina, sono le seguenti:

- a) il fattore di crescita stimolante la formazione di colonie di granulociti e monociti (*Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor = GM-CSF*),
- b) il fattore di crescita stimolante la formazione di colonie di granulociti (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor = G-CSF*),
- c) il fattore di crescita stimolante la formazione di colonie di monociti (*Monocyte Colony-Stimulating Factor = M-CSF*),
- d) il fattore di crescita stimolante la formazione di colonie di megacariociti (*Megakaryocyte Colony-Stimulating Factor = MK-CSF*).

Questi fattori di crescita sono preferenzialmente attivi oltre che sotto l'aspetto proliferativo anche sotto quello differenziativo, sulle prime cellule derivate dai

progenitori *committed*, che costituiscono i precursori più diretti delle cellule delle varie linee ematiche.

La formazione del legame tra una citochina ed il suo specifico recettore innesca un segnale che comporta l'attivazione della via JAK/STAT: STAT si dimerizza ed il dimero viene traslocato nel nucleo dove induce l'attivazione di determinati programmi genici.

Per quanto riguarda l'automantenimento (o autorinnovamento) delle cellule staminali, esso è assicurato dalle due modalità di divisione che le HSC possono effettuare: la divisione asimmetrica e quella simmetrica.

Nella *divisione asimmetrica*, che è quella di più frequente riscontro in condizioni normali, delle due cellule figlie che originano dalla divisione di una HSC, una mantiene il fenotipo esibito dalla cellula genitrice prima della divisione, cioè rimane HSC, mentre l'altra, che risulta capace di dividersi e di differenziarsi nelle varie linee ematiche, viene definita *progenitore comune emopoietico* perché mantiene la multipotenza delle HSC, o anche

*cellula amplificatrice di transito (Transit Amplifying Cell = TAC)* perché va incontro a ripetuti cicli di crescita e di replicazione, espandendosi in maniera esponenziale. La formazione e l'amplificazione di tali progenitori danno ragione del perché nel midollo osseo la maggioranza delle HSC si trovi in riposo replicativo, cioè nella fase G0 del ciclo cellulare, e si divida solo in rare occasioni al fine di mantenere l'omeostasi cellulare ematica. È quindi errato ritenere che per la sostituzione di una cellula del sangue circolante sia sempre necessaria la divisione di una HSC in quanto la presenza di un numero considerevole di TAC (progenitori non ancora *committed*) e di cellule da esse derivate è sempre in grado di soddisfare la fisiologica richiesta proveniente dalla periferia. Il primo commissionamento porta alla comparsa di un *comune progenitore linfoide (LCP)* e di un *comune progenitore mieloide (MCP)*, i quali in seguito alla ricezione di adeguati segnali daranno rispettivamente origine alla serie di cellule linfoidi e mieloidi (Fig. 60.2).

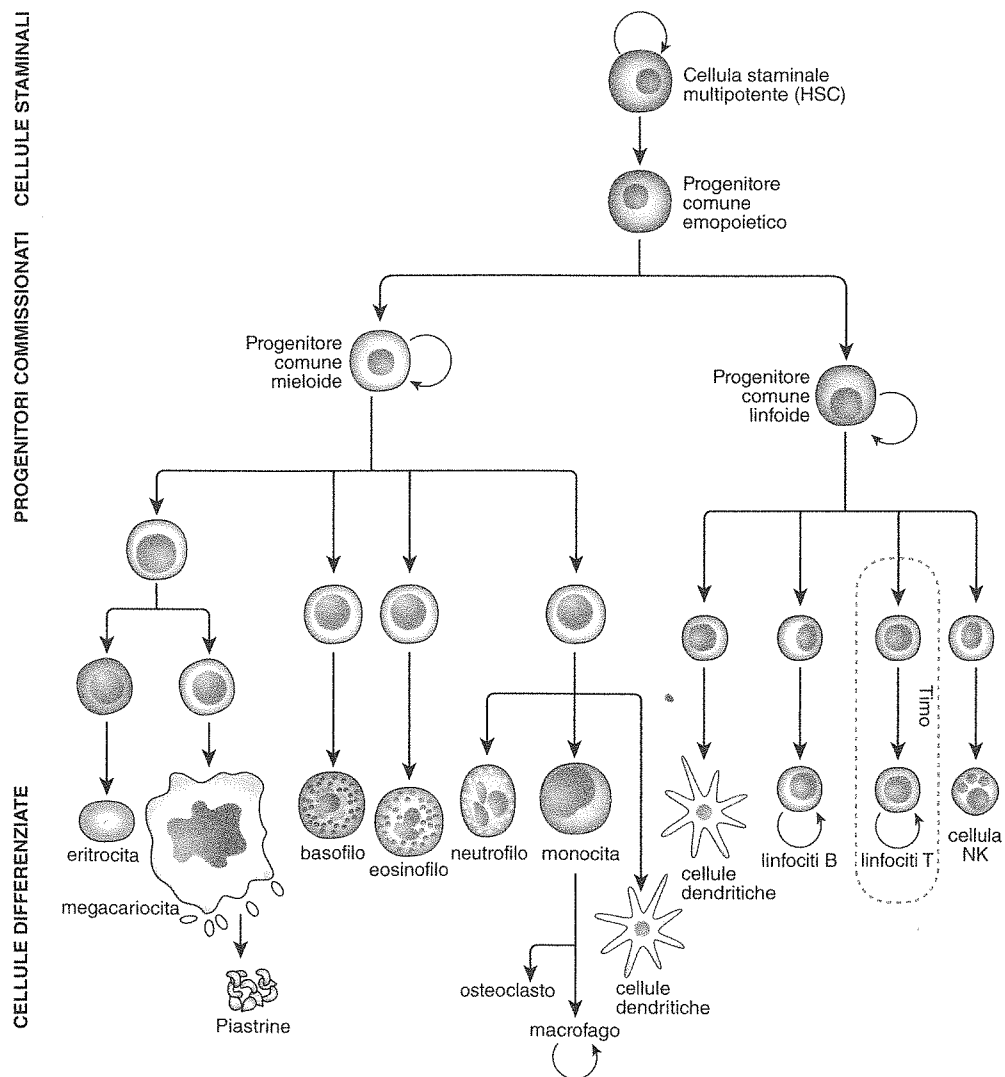


FIG. 60.2 Schema riassuntivo del processo emopoietico (Da Weinberg R.A. *The biology of cancer*. Garland Science, con modifiche).

Anche questi progenitori commissionati esibiscono un elevato potenziale proliferativo con la conseguenza che il numero di cellule mature da essi derivato subisce una notevole amplificazione. In breve, da una singola HSC si possono formare migliaia di cellule mature.

Nel caso che nel compartimento staminale una o più HSC vadano incontro a morte, una o più HSC sopravvissute intraprendono la *divisione simmetrica*: si formano così due HSC, identiche alla genitrice, di cui una sostituisce la genitrice e l'altra una HSC scomparsa, in modo che il *pool* originario di HSC si mantenga numericamente costante (Fig. 60.3). È stato di recente dimostrato che la sostituzione di una HSC scomparsa può avvenire pure per reversione di una TAC a HSC.

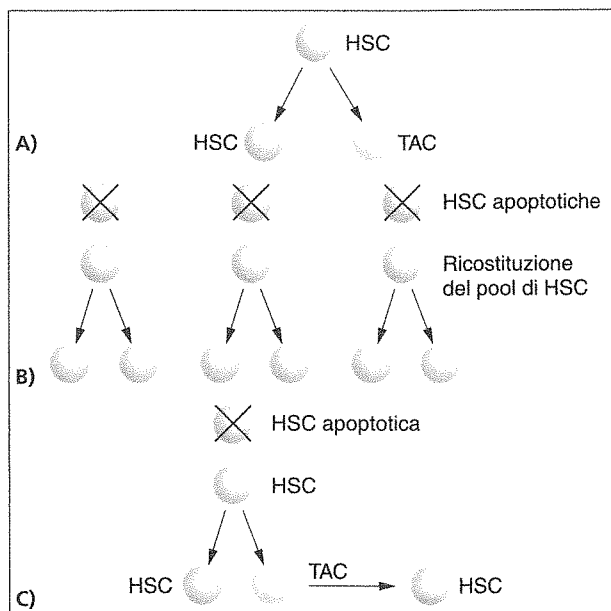
Fino a non molti anni or sono si riteneva che nell'organismo la presenza di cellule staminali adulte (ASC) fosse limitata al midollo osseo ed al tessuto epiteliale, che rappresentano gli esempi più significativi di tessuti, le cui cellule differenziate hanno durata di vita limitata nel tempo, con la conseguenza che al fine del mantenimento dell'omeostasi tissutale si impone la frequente sostituzione delle cellule scomparse. Una serie di ricerche eseguite a partire dall'ultimo decennio del Novecento ha, invece, dimostrato che anche molti altri tessuti dell'organismo, compresi quelli classificati da Giulio Bizzozero come perenni (tessuto muscolare

e tessuto nervoso), cioè costituiti da cellule incapaci di riprodursi, alberga una piccola aliquota di ASC in grado di differenziarsi in cellule nervose o muscolari mature. A differenza delle ESC, che sono, come si è detto, multipotenti perché capaci di differenziarsi in tutti i circa duecento diversi citotipi presenti nell'organismo, le ASC presenti in altri tessuti sono generalmente unipotenti, nel senso che la loro capacità differenziativa si svolge in direzione delle cellule che costituiscono il tessuto in cui esse risiedono.

Nel midollo osseo, infatti, è stata identificata anche la presenza di un'altra categoria di cellule staminali adulte, le cosiddette *cellule mesenchimali adulte* (*Mesenchymal Stem Cells = MSC*), le quali mantengono la pluripotenza delle ESC perché, oltre ad autorinnovarsi, sono in grado di formare cellule differenziate che nel processo ontogenetico derivano dai tre foglietti embrionali. Le MSC si distinguono dalle HSC sia per l'aspetto morfologico, in quanto somigliano ai fibroblasti mentre le HSC si presentano simili ai linfociti di piccole/medie dimensioni, sia anche per la loro più accentuata rarità (1 cellula ogni 100.000 cellule midollari in confronto a quella delle HSC che è di 1 cellula ogni 10.000-20.000 cellule midollari).

È stato anche dimostrato che in particolari condizioni sperimentali le ASC di differenti organi possono riassumere la pluripotenza ed indirizzarsi verso una linea differenziativa diversa da quella del tessuto di origine. Questo fenomeno, definito *plasticità o transdifferenziazione delle ASC*, è oggetto di intensa ricerca in molti laboratori nella speranza di poter riuscire col trapianto di tali cellule ad ottenere un sussidio terapeutico in pazienti affetti da malattie ereditarie o acquisite che comportano la perdita di molte cellule in un determinato organo.

Ciascuna HSC (come del resto ciascuna ASC) è avviluppata da un peculiare microambiente, definito *nicchia*, che espleta non solo una funzione protettiva, difendendo la cellula staminale dal contatto di molte molecole che, in sua assenza, verrebbero in contatto con essa, quali ad es. tossici e mutageni, ma garantendo ad essa la sopravvivenza con la fornitura di diversi fattori, non tutti ancora identificati. La nicchia contenente la HSC è costituita da cellule di supporto (alle quali la HSC aderisce tramite molecole di adesione). Queste producono diversi fattori solubili. Nella nicchia sono anche presenti costituenti dell'ECM e una rete di piccolissimi vasi. Tra le cellule di supporto presenti nella nicchia della HSC prevalgono gli osteoblasti, che aderiscono a mezzo di un sistema adesivo N-caderina/ $\beta$ -catenina alla cellula staminale. Si tratta di un'adesione che comporta non solo l'ancoraggio, ma la stessa sopravvivenza di questa, come dimostrato dal fatto che in coltura le HSC sopravvivono e si replicano solo in presenza di tali osteoblasti. Non sono ancora noti tutti i fattori sintetizzati da tali cellule di supporto.



**FIG. 60.3** L'auto-rinnovo delle cellule staminali emopoietiche (HSC). A) Divisione asimmetrica: dalla divisione di una HSC originano una HSC, che sostituisce la cellula genitrice, ed un progenitore comune o cellula amplificatrice di transito (TAC) destinata alla differenziazione. B) Divisione simmetrica (che si verifica in seguito alla perdita di cellule staminali emopoietiche o durante l'accrescimento di un organo): dalla divisione di una HSC integra derivano due HSC, di cui una sostituisce la genitrice e l'altra una HSC scomparsa, per es. per apoptosi. C) Reversione di una TAC ad HSC per la sostituzione di una HSC perduta.

Più che per le caratteristiche morfologiche che, come si è detto, rendono le HSC simili ai piccoli e medi linfociti, queste cellule sono identificate grazie all'espressione di un marcatore di membrana, il **CD34**, che è una sialomucina, per cui sono definite sotto l'aspetto immunofenotipico **CD34+**.

Le tecniche flussocitometriche consentono l'identificazione e l'isolamento delle cellule esprimenti il CD34, essendo stati sviluppati anticorpi monoclonali che specificamente riconoscono questo marcatore.

Le HSC non esprimono alcuno dei marcatori di membrana che caratterizzano le cellule che da esse derivano nel corso del loro processo differenziativo. È interessante notare che man mano che questo progredisce verso la formazione di cellule mature, l'espressione del CD34 si riduce progressivamente fino a scomparire mentre vengono espressi i marcatori fenotipici caratteristici della linea differenziativa perseguita. Contemporaneamente vengono repressi i geni che codificano per molecole caratteristiche delle altre linee differenziate. Tale osservazione ha stimolato le successive indagini miranti all'identificazione dei geni che nell'attività replicativa e nelle progressive tappe del processo differenziativo vengono attivati e di quelli che, al contrario, vengono repressi.

Rimandando ai trattati di Ematologia per gli adeguati approfondimenti, accenniamo alla dimostrazione che nel processo di autorinnovamento delle HSC si ha l'attivazione di geni che codificano per la famiglia dei fattori di trascrizione della famiglia HOX e di quelli appartenenti alla famiglia GATA e delle vie di traduzione Wnt e Notch. Nel processo differenziativo delle HSC, che comporta la formazione di un progenitore comune linfoide e di un progenitore comune mieloide, si ha, invece, come evento primario, l'espressione dei fattori di trascrizione PU.1 e GATA-1. Si conoscono anche i geni la cui attivazione prelude l'avvio del processo differenziativo verso una determinata linea.

### **60.2.3** Come si è giunti alla scoperta delle cellule staminali emopoietiche

Le prime indagini per la ricerca di cellule progenitrici delle cellule ematiche furono stimulate nel decennio 1940-1950 dall'osservazione che un animale esposto ad una dose massiva di raggi X, nel quale la divisione cellulare è bloccata in tutti i tessuti, compresi quelli emopoietici, con conseguente esito letale, nell'arco di qualche giorno può essere salvato mediante trasfusione di cellule prelevate dal midollo osseo, ottenute da un donatore sano ed immunologicamente compatibile. Si tratta di indagini che hanno rappresentato una delle tappe più significative del progresso scientifico nel campo biomedico perché i risultati ottenuti hanno fornito lo stimolo alle successive ricerche che

sono culminate nella concretizzazione del trapianto di midollo osseo. Difatti, la constatazione che il trapianto di cellule midollari riusciva a salvare un animale letalmente irradiato dimostrava che tra le cellule trasfuse ve ne dovevano essere alcune in grado di colonizzare nell'ospite irradiato e di riequipaggiarlo con tessuto emopoietico autorigenerante. Uno degli organi in cui si localizzano e si moltiplicano le cellule midollari trasfuse è la milza. Quando la milza del topo irradiato è esaminata una o due settimane dopo la trasfusione delle cellule midollari, essa risulta piena di noduli, ognuno dei quali contiene una massa di tessuto emopoietico proliferante capace di produrre linee eritroidi, mieloidi e megacariocitiche. Con l'individuazione di vari marcatori genetici, fu possibile dimostrare che ogni nodulo è un clone cellulare discendente da un'unica cellula. Tale cellula è definita **CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen)**. Il fatto che le CFU-S possono dare origine a colonie che continuano a produrre eritrociti, leucociti e piastrine indicava chiaramente che esse sono dotate di potenziale autorinnovamento e di potenziale clonogenico. Il prosieguo degli studi fece comprendere che la CFU-S è da identificare come cellula staminale emopoietica (HSC), la quale, oltre ad automantenersi può inizialmente differenziarsi in un progenitore comune linfoide ed in un progenitore comune mieloide. Solo successivamente si comprese che questa tappa è preceduta dalla comparsa di un progenitore emopoietico comune (Fig. 60.2).

La cinetica delle cellule staminali venne studiata con varie tecniche, di cui la più utile apparve essere quella della marcatura con dosi "suicide" di timidina radioattiva. Con la somministrazione *in vivo* o *in vitro* di alte dosi di timidina tritiata (3H-timidina), si vide che solo il 10% delle cellule CFU-S veniva ucciso. Questo risultato indicava che la maggioranza della popolazione di queste cellule non sintetizzava DNA e quindi si trovava al di fuori del ciclo cellulare, cioè in fase G0. Quando però *in vivo* la richiesta di immissione di nuove cellule nel sangue aumentava (per esempio per incremento della distruzione periferica), una più alta percentuale (50%) di CFU-S entrava in ciclo.

### **60.2.4** Regolazione della differenziazione dopo il "commitment"

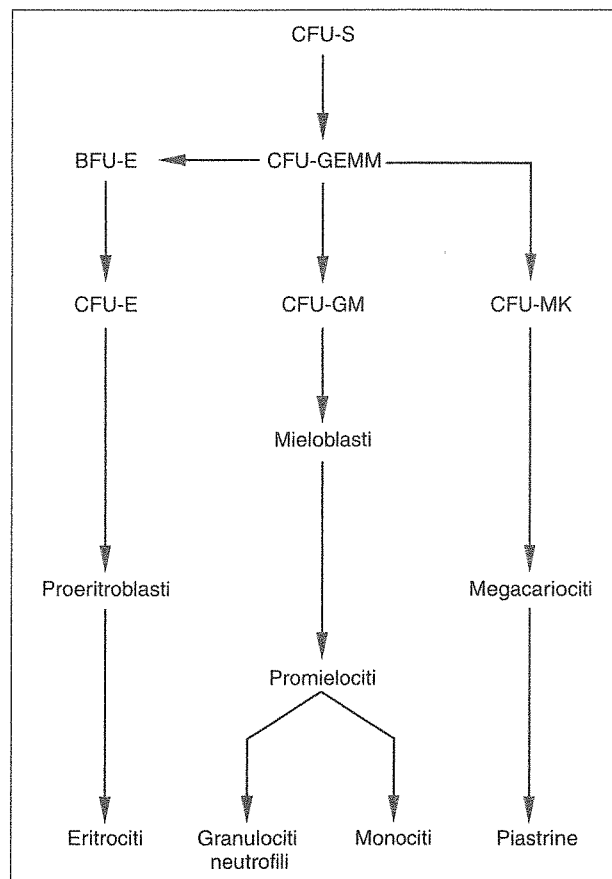
Nel corso delle ricerche sulla coltivazione delle cellule midollari, sulle modalità della loro replicazione e del loro differenziamento verso le varie linee ematiche, si notò che la differenziazione verso la linea eritrocitaria avviene soltanto se nel mezzo di coltura, tra le altre citochine che agiscono stimolando la comparsa dei primi progenitori emopoietici, è presente la eritropoietina (EPO) e che le prime colonie, che compaiono dopo pochi giorni d'incubazione, sono di piccole dimensioni

e risultano formate da non più di una decina di cellule, rappresentate da progenitori della serie mieloide. Queste cellule vennero definite **CFU-GEMM** (*Colony Forming Unit Granulocyte, Erythrocytes, Monocytes and Megakaryocytes*). Dopo un ulteriore periodo di coltura (7-10 giorni) ed a concentrazioni di eritropoietina (EPO) molto più elevate ed in presenza di alcuni fattori di crescita emopoietici (Multi-CSF, detto anche IL-3, e SCF) compaiono colonie di dimensioni più grandi (*bursts*) costituite da circa 5.000 cellule, rappresentate da precursori, che vennero definiti **BFU-E** (*Burst Forming Unit Erythroid*). La maggior parte delle cellule presenti nelle BFC-E è quiescente, anche se dotata di potenziale capacità proliferativa, che viene stimolata dall'aggiunta al terreno di alcune citochine, tra le quali si ricordano l'IL-3 e lo SCF. La loro espressione di recettori per l'EPO (EPO-R) aumenta progressivamente man mano che procede la loro differenziazione verso i progenitori eritrocitari più maturi che da essi derivano che sono stati definiti **CFU-E** (*Colony Forming Unit-Erythrocyte*), nei quali, oltre a risultare aumentata l'espressione degli EPO-R, si ha anche quella dei recettori per la transferrina e di altre molecole specifiche degli eritrociti. Dalle CFU-E, che sono da considerare i diretti precursori della serie eritrocitaria, si forma il **pro-normoblasto**, le cui ulteriori fasi differenziative sono descritte nel par. 60.3.1.

Anche per quanto riguarda la **granulocitopoiesi** e la **megacariocitopoiesi** sono stati identificati i precursori. Il primo di essi è sempre la cellula multipotente **CFU-GEMM**, definita anche **CFU-MIX** (*Colony Forming Unit-Mixed Morphology*). Da questo precursore derivano:

- a) le **CFU-MK** (*Colony Forming Unit Megakaryocyte*), indirizzate per la differenziazione verso i megacariociti, dalla cui frammentazione derivano le piastrine,
- b) le **CFU-GM** (*Colony Forming Unit Granulocyte-Monocyte*), indirizzate per la differenziazione verso la linea granulocitica neutrofila, verso quella monocitaria;
- c) le **CFU-Eo** (*Colony Forming Unit Eosinophil*) indirizzate per la differenziazione verso la linea eosinofila;
- d) le **CFU-Baso** (*Colony Forming Unit Basophil*), indirizzate per la differenziazione verso la linea basofila.

Per la **linfocitopoiesi** si rimanda ai capitoli della sezione di Immunopatologia, tenendo, però, presente che dalle TAC si forma un **precursore comune linfoide** (*Common Lymphoid Precursor = CLP*) e che da esso derivano i linfociti B e le cellule NK, il cui iter maturativo si svolge nel midollo osseo, ed i linfociti T il cui iter maturativo si svolge nel timo.



**FIG. 60.4** Rappresentazione schematica semplificata dell'eritropoiesi e della leucopoiesi. Manca la formazione delle CFU-Eo, delle CFU-Baso e della linea linfocitaria. Per le sigle vedi testo.

La differenziazione avviene sotto l'influenza di determinati fattori di crescita emopoietici, descritti nel par. 60.2.5, che agiscono in maniera gerarchica ed in maniera sinergica con altri fattori di crescita più specificamente responsabili della differenziazione verso una determinata linea. Uno schema semplificato delle varie vie differenziative emopoietiche della serie mieloide è presentato nella figura 60.4.

### 60.2.5 I fattori di crescita emopoietici

I fattori di crescita emopoietici (*Hematopoietic Growth Factors = HGFs*) sono citochine che regolano la proliferazione, la differenziazione e le funzioni delle HSC, dei progenitori comuni che da esse derivano, dei progenitori "committed" e delle varie cellule che si vanno formando nel corso del processo emopoietico. Sono attivi anche sulle cellule che hanno completato la maturazione, esercitando effetti modulatori sulle funzioni da esse espletate.

Sono sintetizzati e secreti da varie cellule, in particolare linfociti T, cellule del sistema monocito-macrofagico e cellule stromali del midollo osseo, con l'eccezione dell'eritropoietina che è sintetizzata nel rene ed



anche dal fegato, e della trombopoietina, che è prodotta pressoché esclusivamente dagli epatociti. Essi agiscono sulle cellule bersaglio che esprimono specifici recettori transmembranacei, alcuni con meccanismo endocrino in quanto prodotti e secreti da cellule situate a distanza dalle HSC, altri con meccanismo paracrino, quando sono sintetizzati e rilasciati dalle cellule di supporto della nicchia. In realtà anche i fattori di crescita circolanti si legano dapprima alle strutture della nicchia, diventando così disponibili per la HSC in essa inclusa. Importante caratteristica dei fattori di crescita emopoietici è la capacità di agire in maniera gerarchica, che però si associa a quella di espletare frequentemente anche un'azione sinergica ed a quella di stimolare in alcune cellule bersaglio la sintesi ed il rilascio di un altro fattore di crescita emopoietico. Osservando la tabella 60.5 in cui è schematicamente riportata l'azione gerarchica dei vari HGFs, si nota che alcuni di essi risultano coinvolti in più di una tappa differenziativa in quanto attivi su diversi progenitori. Ciò significa che sulla stessa cellula possono agire più fattori emopoietici di crescita. Per esempio il CFU-GM non solo indirizza progenitori commissionati immaturi verso le linee neutrofila e monocitaria, ma contribuisce anche ad attivare la proliferazione di progenitori più immaturi.

L'interazione di un HGF con il dominio extracellulare dei suoi specifici recettori induce, come si è detto, l'attivazione della via JACK-STAT, che comporta la formazione di dimeri STAT che traslocano nel nucleo dove attivano la trascrizione di specifici geni. Attraverso JACK può essere attivata anche la via Ras/Raf/Map chinasi con generazione di segnali mitogenici: per es. in seguito all'attivazione del fattore di trascrizione E2F, si innesca la sintesi delle varie cicline che ha come effetto la stimolazione della cellula ad entrare nel ciclo replicativo superando le varie stazioni di controllo interposte tra le fasi G0/G1, G1/S, S/G2 e G2/M. Inoltre, i HGFs innescano un signalling antiapoptotico che potenzia la sopravvivenza cellulare.

### 60.3 Fisiopatologia generale degli eritrociti

Nel descrivere la fisiologia dei globuli rossi è impossibile separare quelli maturi del sangue periferico dai loro precursori nel midollo osseo. Per questo motivo l'insieme degli eritrociti periferici e dei precursori midollari è detto *eritrone*, termine che sottolinea l'unità funzionale tra tutti i globuli rossi.

**TAB. 60.5** Fattori di crescita emopoietici (HGFs) e loro principali effetti sulle cellule bersaglio.

HGFs	Principali effetti
Stem Cell Factor (SCF)	Agisce nelle prime fasi del percorso differenziativo con azione prevalentemente stimolatrice della proliferazione sulle HSC, sui primi progenitori delle linee linfoidi e mieloidi inducendo la formazione delle CFU-GEMM o CFU-MIX. Agisce in maniera sinergica con altri fattori di crescita anche in diverse ulteriori fasi del processo differenziativo su precursori già "committed".
Flt-Ligand (FLT-L)	Agisce come lo SCF nelle primissime fasi del processo differenziativo.
Tumor Necrosis Factor (TNF)	Stimola diverse cellule (in particolare endotelociti, fibroblasti, cellule stromali, linfociti T e macrofagi) alla sintesi ed alla secrezione di vari fattori di crescita emopoietici (GM-CSF, G-CSF, M-CSF).
Interleuchina-1 (IL-1)	Agisce come il TNF.
Multi Colony Stimulating Factor (Multi-CSF), indicato anche come Interleuchina 3 (IL3)	Stimola la proliferazione delle HSC e dei primi progenitori e determina la comparsa delle CFU-GEMM. Stimola l'espressione di recettori per HGFs successivamente attivi. Molti suoi effetti si sovrappongono a quelli del GM-CSF.
Granulocyte, Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF)	Stimola il commissionamento verso le linee granulocitica e monocitica.
Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF)	Stimola la differenziazione verso la linea granulocitica.
Megakaryocyte-Colony Stimulating Factor (M-CSF)	Stimola la differenziazione verso la linea monocitica.
Eritropoietina (EPO)	Stimola la differenziazione verso la linea eritrocitaria.
Trombopoietina(TPO)	Stimola la differenziazione verso la linea megariocitica con formazione delle piastrine.
Interleuchina-4 (IL-4)	Stimola la differenziazione verso la linea basofila.
Interleuchina-5 (IL-5)	Stimola la differenziazione verso la linea basofila.
Interleuchina-6 (IL-6)	Stimola la differenziazione verso la linea linfocitaria.

### 60.3.1 Eritropoiesi

Il termine *eritropoiesi* viene usato per indicare quell'insieme di eventi morfologici e biochimici che porta alla formazione della popolazione eritrocitaria. Dovremo perciò considerare, in questa parte, lo sviluppo morfologico e biochimico dei globuli rossi, il suo controllo ormonale, l'azione di fattori richiesti per la loro proliferazione e maturazione, la loro vita media ed il modo con cui essi vengono distrutti.

#### ■ Sviluppo morfologico e biochimico degli eritrociti

I precursori nucleati degli eritrociti derivano dalle cellule del midollo osseo che nei paragrafi precedenti abbiamo chiamato CFU-E (Fig. 60.5). Il tempo totale di maturazione di questi precursori è di cinque giorni. I primi due giorni sono utilizzati per la divisione cellulare, mentre durante gli altri tre, dedicati quasi esclusivamente alla maturazione cellulare ed alla sintesi di emoglobina, il nucleo è estruso. Dopo questa fase di maturazione, il diretto precursore dell'eritrocita, il reticolocita, rimane nel midollo per altre 24 ore e quindi è rilasciato nella circolazione periferica dove matura

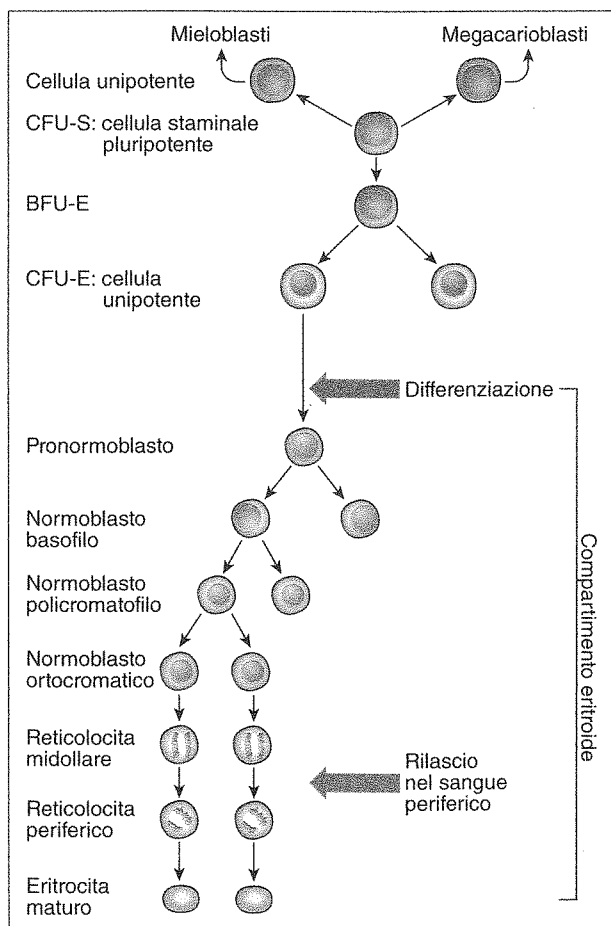


FIG. 60.5 Rappresentazione dell'eritropoiesi con i vari stadi di maturazione nel compartimento eritroide.

in un giorno fino a diventare un globulo rosso adulto. Dal momento che circa l'1% degli eritrociti maturi è distrutto ogni giorno, in un individuo adulto normale, per mantenere l'omeostasi, viene immesso nel sangue periferico un ugual numero di reticolociti (1% dei globuli rossi circolanti) pari a circa  $10^{12}$  eritrociti.

Il *pronormoblasto* o *procritroblasto* (Fig. 60.5) è la prima cellula della serie rossa riconoscibile negli strisci di midollo osseo. Presenta una forma rotonda o leggermente ovale con un diametro di 15-20  $\mu\text{m}$ . Il nucleo è grande, con cromatina finemente punteggiata a zolle ed uno o più nucleoli. Il citoplasma è scarso e si colora intensamente in blu (in strisci colorati con il May-Grunwald-Giemsa). Nella maggior parte di queste cellule una zona chiara paranucleare corrisponde all'apparato di Golgi (area acropasmatica).

Il *normoblasto* o *eritroblasto basofilo* è più piccolo del pronormoblasto con un diametro variabile da 10 a 18  $\mu\text{m}$ . Anche il rapporto nucleo-citoplasmatico è inferiore a quello del pronormoblasto. Il citoplasma è intensamente basofilo; il disegno cromatinico è molto più grossolano e rivela piccole massarelle addensate adiacenti alla membrana nucleare; i nucleoli sono poco evidenti o assenti.

Nel *normoblasto policromatofilo* il rapporto nucleo-citoplasmatico è ulteriormente diminuito. Il citoplasma presenta colorazione policromatofila a causa dell'iniziale emoglobinizzazione. Questa è l'ultima cellula della serie eritroblastica capace di attività mitotica.

Il *normoblasto ortocromatico*, non più in grado di dividersi, misura 10-12  $\mu\text{m}$  di diametro. Il nucleo è piccolo e contiene cromatina intensamente addensata. Le cellule più mature possono presentare un nucleo picnotico, intensamente colorato, che è spesso situato eccentricamente prima della sua espulsione. Il citoplasma è acidofilo a causa del progressivo incremento dell'emoglobinizzazione. Il normoblasto ortocromatico diventa reticolocita dopo aver espulso il nucleo (picnosi). Benché alcune osservazioni in condizioni patologiche abbiano suggerito che la frammentazione nucleare (*carioressi*) rappresenta il meccanismo mediante il quale i nuclei vengono eliminati, il processo alternativo di un'espulsione attiva del nucleo sembra essere il meccanismo più probabile.

Con l'espulsione del nucleo si ha la formazione del *reticolocita*. Questa cellula contiene poliribosomi e qualche mitocondrio. È un po' più grande dell'eritrocita maturo ed ha una leggera e diffusa basofilia. Con colorazioni con il blu cresil brillante o con il blu di metilene, gli organelli citoplasmatici formano un reticolo blu che può essere facilmente riconosciuto al microscopio ottico. Il reticolocita rimane nel pool midollare per circa 24 ore, quindi è rilasciato in circolo. Durante il suo soggiorno nel midollo e nelle prime ore nel sangue periferico perde mitocondri e ribosomi e quindi anche la capacità di sintetizzare emoglobina.

Durante l'ordinata maturazione ora descritta, si ha la perdita di una certa quantità di cellule e si calcola che circa il 10% dei precursori degli eritrociti muore ancora nel periodo midollare (*eritropoiesi inefficace*). La ragione di questa mortalità cellulare non è nota. In certi disordini della maturazione dei globuli rossi, il grado di eritropoiesi inefficace è molto più alto del 10%.

I cambiamenti morfologici della maturazione eritrocitaria si accompagnano ad importanti modificazioni biochimiche dei precursori eritrocitari (Fig. 60.6). I precursori dei globuli rossi hanno un apparato di Golgi e mitocondri ben formati. Essi possono sintetizzare RNA, DNA e proteine ed hanno un metabolismo ossidativo efficiente. Alla tappa del normoblasto policromatofilo, la sintesi di DNA ed RNA cessa. A questo punto quasi tutta la sintesi proteica non emoglobinica è completa, per cui gli eritrociti sono ben equipaggiati di tutti i vari sistemi enzimatici e degli antigeni di superficie. Poiché la sintesi di RNA cessa, tutta la successiva sintesi proteica deve utilizzare RNA messaggero preformato e la quantità di proteine prodotte dipende dalla stabilità di queste molecole. Con l'estruzione del nucleo, il reti-

colocita che ancora contiene polisomi e mitocondri può sintetizzare proteine ed eme e conserva ancora alcune capacità ossidative. Dopo ulteriore maturazione, i mitocondri e l'RNA sono perduti e le cellule sono quindi capaci di metabolizzare glucosio solo attraverso il ciclo di Embden-Meyerhof e lo shunt degli esoso monofosfati.

### ■ La regolazione dell'eritropoiesi

La velocità dell'eritropoiesi è regolata in modo che la perdita giornaliera dell'1% degli eritrociti sia equilibrata da un'uguale produzione di reticolociti. Essa è governata dalla velocità di trasporto dell'ossigeno ai tessuti. L'ossigenazione tissutale dipende da molti fattori, tra cui la concentrazione ossiemoglobinica del sangue, la gittata cardiaca e la velocità con cui il sangue cede l'ossigeno ai tessuti. L'ipotesi che ci potesse essere un mediatore umorale tra lo stimolo ipossico e l'eritropoiesi fu dimostrata come vera da Reismann. Egli prese un paio di ratti parabiotici (animali la cui circolazione era messa chirurgicamente in comune) e dimostrò che se uno di essi era tenuto in un'atmosfera ipossica anche nell'altro l'eritropoiesi era stimolata. Questo stava a significare che un ormone, prodotto nell'animale ipossico, stimolava, attraverso la circolazione comune, il midollo del partner. Questo ormone fu in seguito chiamato *eritropoietina* (EPO). Esso è una glicoproteina con un peso molecolare di 33.000 daltons. La sua concentrazione plasmatica, misurata con metodi radioimmunologici, è di 0,02 U/ml. La secrezione giornaliera si aggira sulle 4 Unità; gli individui di sesso maschile ne producono più di quelli di sesso femminile. La sua semivita è inferiore alle 5 ore; circa il 10% è escreto con le urine, mentre il resto è metabolizzato nel fegato. Il gene dell'eritropoietina è stato clonato ed espresso in un sistema *in vitro*. L'organo di produzione dell'ormone è il rene e, precisamente, l'apparato juxtaglomerulare. Durante la vita fetale la maggior fonte di eritropoietina è il fegato. Nell'uomo anche dopo asportazione dei reni rimane ancora una certa produzione di ormone, probabilmente di origine epatica, che è immunologicamente indistinguibile dalla eritropoietina renale.

L'eritropoietina non agisce sulle cellule staminali ma sul compartimento delle cellule "committed". Infatti durante la maturazione BFU-E → CFU-E aumenta la sensibilità cellulare all'ormone. Questo riflette la comparsa di specifici recettori durante il processo di maturazione. L'interazione EPO-recettore è seguita da dimerizzazione recettoriale internalizzazione e da aumento dell'attività trascrizionale e translazionale.

L'eritropoietina, difatti, determina:

- Aumento della velocità di sintesi dell'emoglobina negli eritroblasti in via di sviluppo.
- Stimolazione della sintesi di proteine non emoglobiniche e della maturazione cellulare.
- Aumento della velocità di transito dei precursori dei globuli rossi attraverso il loro ciclo maturativo e dell'immissione in circolo.

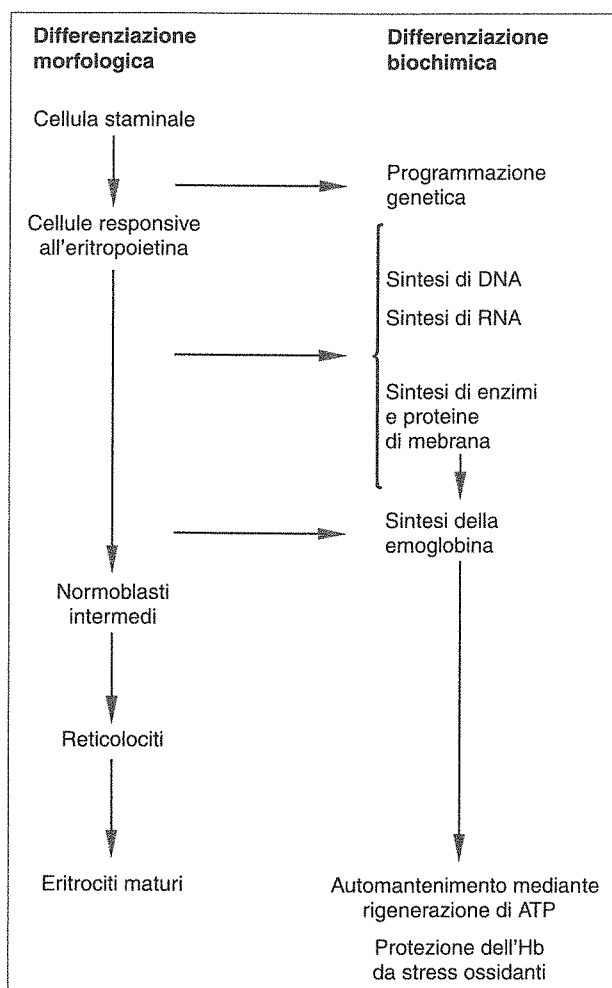


FIG. 60.6 Rappresentazione schematica dei rapporti tra differenziazione morfologica e biochimica nell'eritropoiesi.

d) Protezione delle cellule progenitrici dall'apoptosi tramite l'attivazione della Januschinasi 2 e di Start 5 che inducono l'espressione delle proteine antiapoptotiche della famiglia Bcl2.

Nei precursori eritrocitari esposti ad eritropoietina la sintesi di RNA aumenta in circa 15 min. Il principale fattore che controlla la velocità di produzione dell'eritropoietina è il fattore trascrizionale HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor 1*). Pertanto, nelle cellule che sintetizzano l'eritropoietina, la ridotta tensione dell'O<sub>2</sub> del sangue arterioso è alla base dell'attivazione di HIF-1 e conseguentemente della sintesi e del rilascio dell'eritropoietina. Al contrario, l'aumentata fornitura di O<sub>2</sub> ai tessuti (da poliglobulia o da altre cause) riduce la produzione di eritropoietina. Anche altri ormoni (androgeni, corticosteroidi, ormoni tiroidei, agonisti  $\beta$ -adrenergici ed alcune prostaglandine) influenzano la produzione di eritrociti, esercitando un effetto modulatore. La presenza di recettori specifici per i suddetti ormoni è stata dimostrata nei progenitori degli eritrociti e ciò spiega lo stimolo che essi esercitano sulla produzione di colonie eritroidi. Si tratta, quindi, di un ben bilanciato meccanismo, che può essere modificato da molti fattori che alterano il contenuto arterioso di ossigeno e la sua disponibilità per i tessuti. Tra questi ricordiamo la gittata cardiaca, la funzione polmonare e la velocità di dissociazione dell'ossigeno dall'emoglobina negli eritrociti (Fig. 60.7).

La stimolazione dell'eritropoiesi da parte della eritropoietina produce certe modificazioni cellulari ben definite. A causa del diminuito tempo di transito nel midollo, compaiono nel sangue periferico dei macrociti policromatici accompagnati da una reticolocitosi.

Anche il midollo osseo mostra i segni dell'aumentata proliferazione e differenziazione dei precursori eritroi-

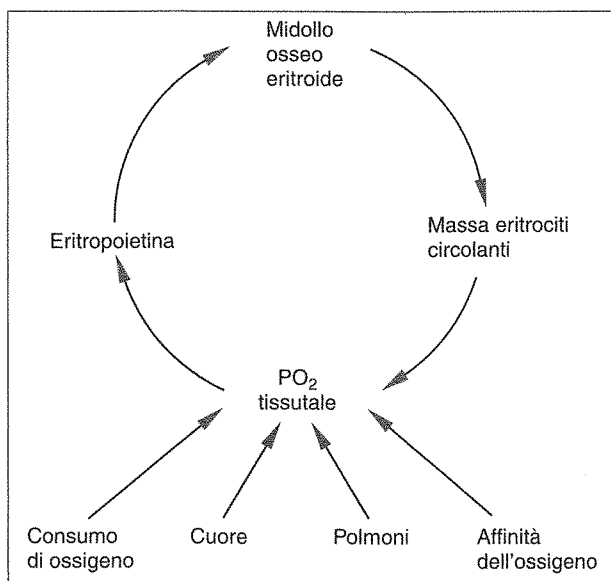


Fig. 60.7 Fattori coinvolti nella regolazione della eritropoiesi.

di con uno spostamento nel rapporto mieloide:eritroide, normalmente 3:1, verso l'unità. Un terzo effetto dell'aumentata proliferazione è l'espansione del midollo osseo eritroide nelle ossa lunghe, un ritorno ai siti fetali dell'eritropoiesi. Tutte queste modificazioni si vedono in quelle condizioni patologiche in cui c'è un'aumentata velocità della produzione eritrocitaria.

#### ■ Fattori richiesti per una normale eritropoiesi

I fattori maggiormente richiesti per una normale eritropoiesi sono: ferro, vitamina B12, folati, vitamina B6, acido ascorbico, riboflavina, vitamina E, aminoacidi e proteine, alcuni metalli (rame, manganese, cobalto, zinco).

**Ferro.** L'organismo contiene da 4 a 6 g di ferro sotto forma di composti eminici, quali emoglobina, mioglobina, citocromi, perossidasi e catalasi, o non eminici: transferrina, ferritina, emosiderina. Queste ultime proteine si trovano soprattutto nelle cellule reticolo-endoteliali del fegato, della milza e del midollo osseo e costituiscono una riserva del metallo che può essere mobilizzata quando la richiesta aumenta.

Le varie tappe del metabolismo del ferro si possono dividere in: assorbimento, trasporto, utilizzazione e deposito.

Esse sono state descritte nel Capitolo 50 a cui si rimanda. Sembra, però, utile in questa sede richiamare l'attenzione del lettore sull'importanza che assume la regolazione dell'assorbimento intestinale del ferro poiché soltanto da essa dipende in condizioni fisiologiche il mantenimento dell'equilibrio tra entrate e perdite del metallo in grado di impedire che nell'organismo si verifichi un suo sovraccarico o un suo deficit, l'uno e l'altro causa della comparsa di manifestazioni patologiche. Difatti, l'organismo non dispone di una specifica via di escrezione del ferro che avviene soltanto attraverso il sudore, la desquamazione cellulare, le urine e le feci, ed in quantità di 1 mg al giorno. La sola via che fa perdere all'organismo una maggiore quantità di ferro è l'emorragia, tanto che nella donna nel periodo fertile della vita se ne perdono in media 15-30 mg durante ogni ciclo mestruale.

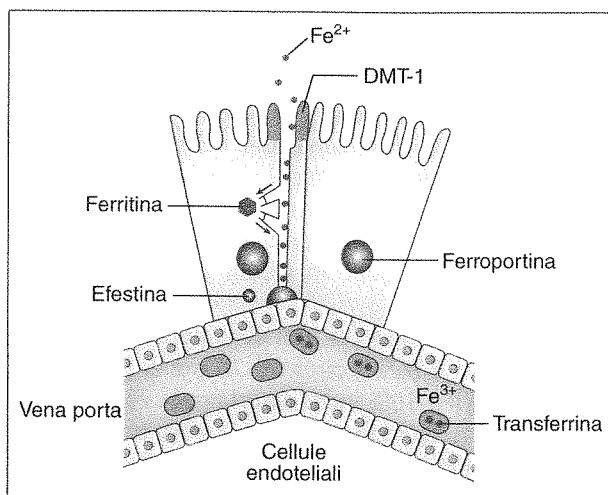
Il contenuto in ferro di una dieta normale nei Paesi industrializzati è pari a circa 10-25 mg al giorno, dei quali soltanto il 5-10% viene assorbito. I cibi a maggior contenuto in ferro sono i legumi, le uova e soprattutto la carne rossa ed il fegato; in essi il metallo è presente sotto varie forme chimiche, ma per quanto riguarda il loro assorbimento intestinale, i composti del ferro presenti nei cibi possono essere distinti in due gruppi, che vengono definiti *pools* del ferro alimentare:

- il *pool eminico*, costituito dall'emoglobina dalla mioglobina, dai citocromi, etc e
- il *pool non eminico*, costituito da tutti gli altri composti, sotto forma di idrossidi ferrici e di complessi ferro proteici.

Il gruppo eme del *pool* eminico presente negli alimenti viene assorbito come tale dalle cellule duodenali ad opera di un suo specifico trasportatore non ancora del tutto identificato, per cui passa direttamente dal lume intestinale nelle cellule della mucosa senza essere influenzato da altri costituenti dietetici e dalle secrezioni intestinali. Nelle cellule della mucosa intestinale l'enzima emeossigenasi converte il gruppo eme in CO, biliverdina e  $Fe^{2+}$ ; quest'ultimo viene in parte fissato alla ferritina, dove permane sotto forma di deposito, ed in parte dalla ferroportina che lo esporta nel sangue, come si dirà tra poco.

Il ferro presente nel *pool* non eminico, invece, viene assorbito dalle stesse cellule soltanto dopo essere stato rilasciato nello stomaco, per azione della pepsina, dai composti a cui è legato e, quindi, ridotto a  $Fe^{2+}$ . La riduzione, che rappresenta una condizione indispensabile al fine dello assorbimento, avviene in parte nello stomaco ad opera del pH acido dei succhi gastrici ed in parte nel duodeno ad opera di una reduttasi ferrica espressa sulla faccia luminale delle cellule duodenali ed è facilitata dalla presenza di agenti riducenti.

Una proteina espressa sulla faccia luminale della membrana plasmatica delle cellule intestinali, **DMT-1** (**Divalent Metal Transporter**), che funziona da trasportatore di metalli divalenti, provvede alla penetrazione di  $Fe^{2+}$  nel citoplasma dove esso in parte viene fissato dalla **ferritina** ed in parte raggiunge la faccia basolaterale della membrana plasmatica, dove è presente un'altra proteina, la **ferroportina**, che provvede anche al suo rilascio nel sangue, dopo che un enzima ferroossidasi, la **efestina**, ha ossidato  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  (Fig. 60.8).



**FIG. 60.8** Assorbimento del ferro alimentare da parte degli enterociti. Il ferro del *pool* non eminico alimentare viene assorbito soltanto sotto forma di  $Fe^{2+}$ . Esso, dopo essere stato internalizzato nel citoplasma degli enterociti ad opera della proteina DMT-1, viene in parte fissato dalla ferritina ed in parte trasferito nel sangue, dove si lega sotto forma di  $Fe^{3+}$  alla transferrina. L'enzima ferroossidasi efestina (non indicato nella figura), collocato in prossimità della ferroportina, converte  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ , immediatamente prima del suo rilascio nel sangue.

Nel sangue il  $Fe^{3+}$  proveniente dall'assorbimento intestinale è trasportato da una proteina sintetizzata dagli epatociti, la **transferrina**, che contiene due siti di legame per  $Fe^{3+}$ , ma risulta saturata dal metallo solo per il 30%. La valutazione del livello di saturazione della transferrina rappresenta il dato di laboratorio utile per la stima della quantità di ferro nell'organismo in quanto aumenta in condizioni di sovraccarico e si riduce in condizioni di carenza del metallo.

Sulla transferrina, difatti, si fissa anche il metallo di origine endogena, cioè quello rilasciato dai macrofagi che hanno fagocitato i globuli rossi senescenti ed anche quello rilasciato dagli epatociti e dalle cellule contenenti composti del ferro, ad es. mioglobina, citocromi. etc. La transferrina che non ha fissato ferro viene indicata col termine di **apotransferrina**.

Poiché in condizioni normali poco ferro è assorbito con la dieta e poiché la quantità eliminata con le urine o in altro modo è estremamente piccola, un'alta proporzione del ferro totale, che è contenuta nei siti di deposito dell'organismo, deve essere continuamente ridistribuita in parecchi circoli metabolici. In altre parole, l'organismo ricicla il ferro in esso presente ricavandolo dai depositi che sono da considerare dei veri e propri siti di stoccaggio del metallo. Nell'organismo è difatti presente una riserva di ferro che è più scarsa nella donna (30-40 mg/kg) che nell'uomo (50-55 mg/kg), fatto questo che spiega, sia pure in parte, la maggiore frequenza della carenza marziale nel sesso femminile.

Le cellule del sistema reticoloendoteliale, in particolare quelle del fegato, della milza e del midollo osseo, costituiscono una buona parte dei siti di riserva del ferro perché esse provvedono alla fagocitosi dei globuli rossi che hanno concluso il loro ciclo vitale, lo trattengono sotto forma di ferritina e/o di emosiderina per rilasciarlo quando la transferrina trasporta poco ferro.

Questa riserva, da alcuni definita *pool* del ferro, in cui il metallo è presente in quantità pari a circa un terzo di quella presente nelle emazie, è di due tipi:

- a) riserva rapidamente disponibile in cui il metallo è contenuto nella ferritina.
- b) riserva disponibile più lentamente sotto forma di emosiderina.

Secondo alcuni autori può essere considerata come riserva anche la quantità di ferro presente nelle emazie e nei loro precursori, per la quale è stato coniato il termine di riserva (o *pool*) funzionale del ferro.

Per inciso si ricorda che la ferritina che non ha fissato il metallo è definita **apoferritina**; questa è una molecola del p.m. di 500.00 Da, composta da 24 subunità identiche, che può legare fino a 4500 atomi di ferro in forma di ossido ferrico.

Dalla ferritina deriva l'*emosiderina*, che è un complesso ferro proteico insolubile che si forma da essa in seguito alla parziale digestione operata dagli enzimi lisosomiali, la cui presenza sotto forma di granuli nelle cellule è identificabile dopo colorazione col metodo di Perls al bleu di Prussia.

Il ferro viene ceduto dalla transferrina a tutte le cellule che esprimono specifici recettori di membrana per il complesso transferrina-ferro, i cosiddetti *TfR*, di cui si conoscono due tipi *TfR-1*, espressi praticamente da tutte le cellule, e *TfR-2*, espressi dalle cellule eritroidi, dagli epatociti, dalle cellule duodenali. I due tipi di recettore si differenziano per la diversa affinità verso il metallo.

L'espressione dei *TfR* varia nel senso che essa è sottoposta ad una *up-regulation* quando poco ferro è trasportato dalla transferrina e, viceversa, ad una *down regulation* in caso contrario. Di questi recettori è stata identificata anche una forma solubile (*sTfR*) complessata alla transferrina.

Sulla base di quanto si è detto, si comprende che sia la captazione del ferro dal lume intestinale da parte delle cellule duodenali che quella operata da tutte le cellule dell'organismo che esprimono *TfR* varia a seconda della disponibilità del metallo nell'organismo, in breve a seconda del grado di saturazione della transferrina.

Per quanto riguarda l'assorbimento intestinale, è necessario tenere presente che l'espressione dei *TfR* da parte dei duodenociti ha una sua importante ragione d'essere per il fatto che la quantità di ferro che essi ricevono dalla transferrina contribuisce ad innescare un complesso meccanismo regolatorio dell'assorbimento intestinale del ferro, il quale, anche se non ancora definitivamente stabilito nella tappe molecolari con cui si svolge, assume un enorme significato per la comprensione della regolazione dell'omeostasi di questo metallo. Difatti, attraverso i *TfR*, le cellule duodenali, che sono elementi labili, durante il loro sviluppo che avviene nelle cripte del Lieberkunn, incamerano ferro dalla transferrina attraverso i *TfR* espressi sulla loro faccia basolaterale per cui a maturazione completata, cioè quando si posizionano sulla superficie assorbente duodenale, contengono già ferro in una quantità che dipende dalla quantità di metallo ad essi ceduta dalla transferrina.

La regolazione dell'assunzione del ferro da parte dei duodenociti in via di sviluppo dipende dal fatto che i *TfR* da essi espressi agiscono anche da sensori della quantità di metallo trasportata dalla transferrina sotto il controllo di una proteina, posizionata in stretta vicinanza ad essi e definita *HFE* (*High FErrum*), codificata dall'omologo gene, mappato nel cromosoma 6, le cui mutazioni inattivanti causano una forma di emocromatosi, una malattia ereditaria che determina accumulo di ferro nell'organismo (Fig. 60.9).

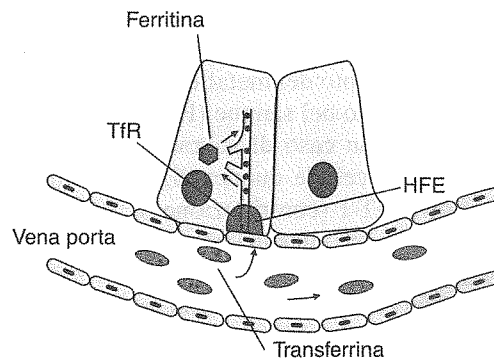


FIG. 60.9 Regolazione dell'assorbimento del ferro da parte dei *TfR* delle cellule duodenali durante la loro maturazione sotto il controllo della proteina *HFE*.

In caso di scarso trasporto di ferro da parte della transferrina, i duodenociti in via di sviluppo ne assumono poco con la conseguenza che a maturazione completata poco metallo sarà presente nel loro citoplasma e molto ne verrà assorbito dal lume intestinale; quando invece la transferrina è saturata di ferro essi ne assorbono un quantità maggiore con opposto effetto. Il meccanismo regolatorio è innescato nelle cellule duodenali dalla quantità di ferro in esse contenuta, che è avvertita da due sensori in essa presenti. Si tratta di due proteine definite *IRP-1* e *IRP-2* (*IRP = Iron-Responsive element binding Proteins*), che si diversificano, oltre che per differenze strutturali, anche per la loro diversa distribuzione nei vari citotipi. Esse esercitano un controllo post-trascrizionale sull'assorbimento e sul deposito intracellulare del ferro interagendo con specifiche sequenze (*IREs = Iron Response Elements*) di alcuni mRNA trascritti da geni che codificano per proteine coinvolte nelle due suddette funzioni (*TfR* e ferritina *DMT-1* e ferroportina), dei quali regolano la velocità di traduzione a seconda della quantità di ferro presente nell'ambiente intracellulare.

In alcuni mRNAs, le *IREs* sono presenti all'estremità 3', in altri invece all'estremità 5'; il legame delle *IRP* con le prime blocca la traduzione in proteine, mentre il legame con le seconde stabilizza la molecola di mRNA e stimola la traduzione. Pertanto, *IRP-1*, che funziona anche come aconitasi citoplasmatica, oltre che come proteina legante *IRE*, assume questa seconda funzione quando vi è carenza intracellulare di ferro, il che le consente di legare la *IRE* localizzata nella estremità 5' dello mRNA per la apoferritina con conseguente blocco della loro traduzione che si estrinseca con una minore possibilità di trattenere ferro nei duodenociti e quindi con un aumento della possibilità di riversarlo nel sangue. Questa ultima possibilità risulta incrementata anche dal fatto che, sempre nelle stesse condizioni di carenza intracellulare del metallo, la *IRP-1* si lega alle *IREs* presenti nella regione 3' terminale negli mRNA per il *DMT-1*

e per la ferroportina con stimolazione della traduzione nelle rispettive proteine e conseguente incremento sia dell'assorbimento del metallo dal lume intestinale che del suo rilascio nel sangue (Fig. 60.10).

Al contrario, in caso di sovraccarico di ferro nel citoplasma delle cellule duodenali, si formano poche molecole di DMT-1 (con riduzione dell'assorbimento del metallo dal lume intestinale) e molte di apoferritina con conseguente aumento del suo deposito nella ferritina dei duodenociti e riduzione della sua immissione nel sangue, in quanto IRP-1 riassume la sua attività aconitica. IRP-2 agisce in maniera simile, ma essendo priva di funzione aconitica, appare probabile che essa in caso di sovraccarico di ferro si distacchi dalla IRE.

Questo meccanismo è attivo anche negli epatociti, nelle cellule eritroidi e praticamente in tutte le cellule nelle quali, quando sono carenti del metallo, si incrementa la sintesi dei TfR e nel caso degli epatociti, anche quella della transferrina, adibita, come si è detto, al trasporto del metallo nel sangue. Ulteriori ricerche si rendono, però, necessarie sia per meglio definire il ruolo di IRP-2 che per chiarire il meccanismo nei suoi dettagli, soprattutto nel caso di sovraccarico di ferro.

Oltre al suddetto meccanismo, che potremmo definire intracrinico perché si innesca e si realizza all'interno delle cellule, alla regolazione del bilancio del ferro concorre un vero e proprio meccanismo endocrino operato dall'*hepcidina*, che è un peptide di 24 aminoacidi, codificato come pre-pro ormone di 84 aminoacidi dal gene HAMP (Hepcidin Antimicrobial Peptide), espresso negli epatociti. La sua sintesi ed il suo rilascio nel sangue sono regolati da due altri geni e precisamente

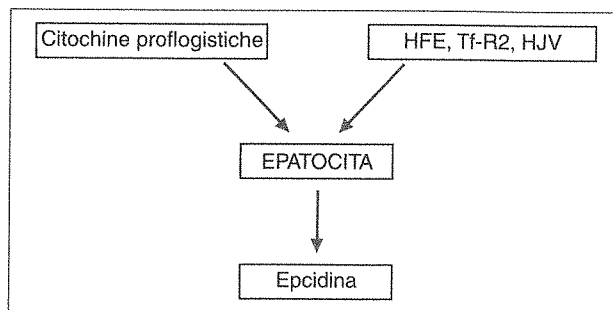


FIG. 60.11 Il rilascio di hepcidina dagli epatociti, che la sintetizzano, è stimolato dalle citochine proinfiammatorie e dai geni che codificano per HFE, TfR e HJV. Questi geni perdono la suddetta attività quando sono bloccati da mutazioni inattivanti.

dal gene HFE, a cui si è già fatto cenno, e dal gene HJV, mappato nel cromosoma 1,q21, che codifica per l'*emojuvelina*, che è un'altra proteina, coinvolta nel metabolismo del ferro. Il rilascio del peptide è anche stimolato dalle citochine proinfiammatorie (Fig. 60.11).

L'hepcidina è una molecola bifunzionale perché agisce non solo come ormone, ma anche come microbicida, come del resto si evince dal nome che per essa venne coniato (da *ep*, perché sintetizzata dagli epatociti e *cidina* per la sua attività citocida nei riguardi di alcuni microrganismi, in particolare dei funghi).

L'hepcidina presiede alla regolazione del passaggio nel sangue sia del ferro esogeno che di quello endogeno, agendo sugli enterociti, sui macrofagi e sugli stessi epatociti, nei quali inibisce la sintesi della ferroportina, che come è stato detto, presiede all'esportazione del ferro dalle cellule nel sangue determinando in esse

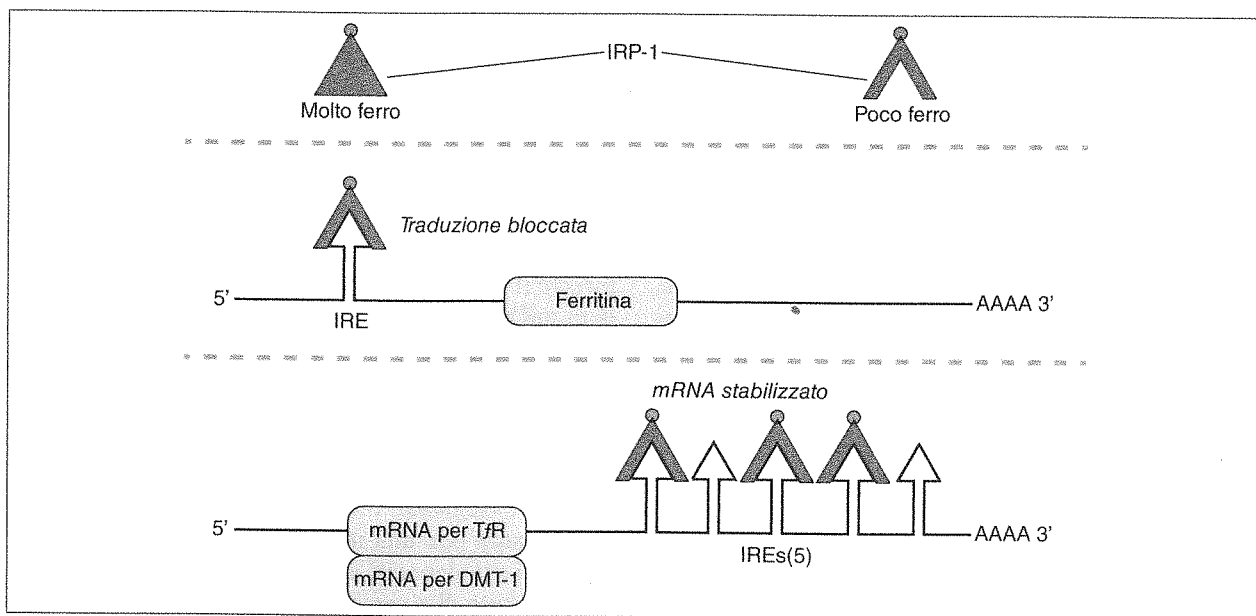


FIG. 60.10 Effetti della concentrazione intracellulare del ferro nelle cellule duodenali ai fini della regolazione dell'assorbimento del metallo di origine alimentare. Quando la concentrazione intracellulare del metallo è bassa, la proteina IRP-1 (Iron-Responsive element binding Protein) blocca la traduzione in proteina nello RNA per la ferritina (localizzata in posizione 5') e stimola la traduzione degli mRNAs per DMT-1, ferroportina e TfR nei quali le IRE sono localizzate in posizione 3'.

un accumulo del metallo. Ne consegue che in caso di eccesso di epcidina si blocca o si riduce nelle cellule duodenali l'esportazione del ferro alla transferrina, la quale conseguentemente ridurrà l'apporto di ferro alle cellule dell'organismo.

Ciò è quanto avviene nel corso dei processi flogistici cronici in cui la stimolazione da parte delle citochine proflogistiche determina negli epatociti un'eccessivo rilascio di epcidina, che causa la riduzione o il blocco dell'esportazione del ferro alla transferrina, sia da parte delle cellule duodenali che da parte di tutte le cellule che riciclano il ferro ed anche, con meccanismo autocrino, da parte degli stessi epatociti. Ciò provoca una iposideremia che può determinare la comparsa di un'anemia ipocromica dovuta allo scarso apporto di ferro alle cellule midollari che presiedono all'eritropoiesi.

Al contrario, mutazioni inattivanti dei geni HAMP, HFE, HJV, che comportano una ridotta sintesi di epcidina, con un conseguente ridotto o assente controllo sulla ferroportina, provocano una eccessiva esportazione di ferro dalle varie cellule alla transferrina e diventano responsabili della trasmissione di alcune forme di emocromatosi ereditaria.

**Vitamina B12.** Per vitamina B12 si intende un gruppo di sostanze chimicamente affini (*cobalamine*) la cui struttura è costituita da due parti principali: un gruppo planare (anello corrinico) che si lega ad un nucleotide (5,6-dimetilbenzimidazolo legato a ribofosfato) disposto inferiormente e quasi perpendicolarmente ad esso (Fig. 60.12). L'anello corrinico è simile a quello delle porfirine ed è formato da 4 anelli pirrolici (A,B,C,D) che legano centralmente un atomo di cobalto (Co). Il Co può legare covalentemente, al di sopra dell'anello corrinico, diversi radicali, a seconda dei quali prende nome il particolare composto cobalaminico:  $-\text{CN}$  (cianocobalamina),  $-\text{OH}$  (idrossicobalamina),  $-\text{CH}_3$  (metilcobalamina) e 5-desossi-5'-adenosina (adenosilcobalamina). L'adenosilcobalamina è la principale forma della vitamina B12 in natura. L'esposizione alla luce converte rapidamente l'idrossicobalamina in adenosil e metilcobalamina, che sono i coenzimi fisiologici. La cianocobalamina è la forma più stabile e perciò è quella prodotta commercialmente dalla fermentazione batterica. È solubile in acqua e stabile al calore.

La vitamina B12 naturale è sintetizzata solo da alcuni microorganismi. L'uomo la ottiene dai cibi (carne, fegato, pesce, uova, latte). Durante la cottura dei cibi parte della vitamina viene degradata, soprattutto se la cottura è prolungata o condotta in condizioni alcaline ad alta temperatura (bollitura del latte).

Le riserve di un uomo adulto normale si aggirano sui 5 mg. Il fegato ne contiene 1  $\mu\text{g/g}$ . La maggior parte si trova nei mitocondri come adenosilcobalamina mentre la metilcobalamina è la forma predominante nel sangue. Il fabbisogno giornaliero è intorno ai 2  $\mu\text{g}$ .

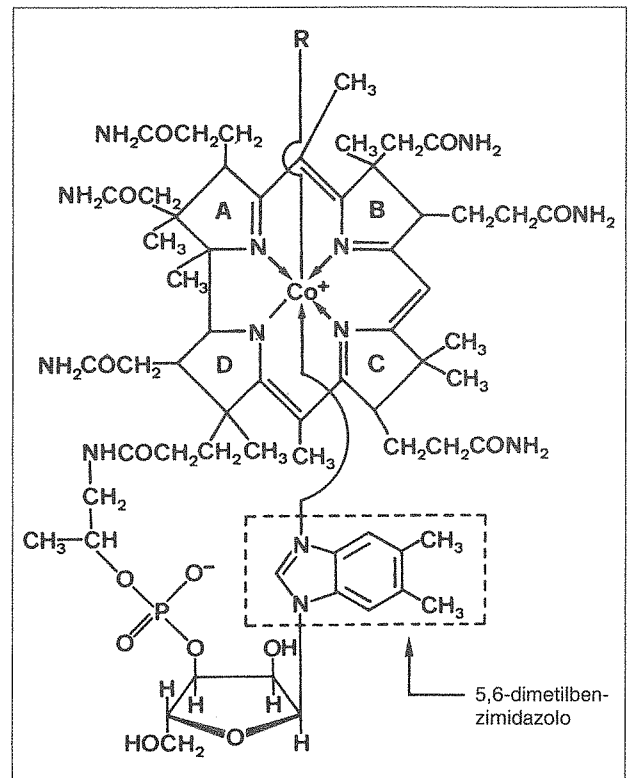


Fig. 60.12 Vitamina B12: cianocobalamina.

La perdita obbligatoria giornaliera, che è di 1-2  $\mu\text{g}$  al giorno, si riduce proporzionalmente al ridursi delle riserve. In pratica occorrono da due a quattro anni prima che la mancanza completa di assorbimento della vitamina (per esempio per gastrectomia totale) si manifesti come carenza.

Nell'uomo esistono due meccanismi di assorbimento intestinale: uno attivo e molto efficiente, l'altro passivo ed a bassa efficienza. Dopo essere stata ingerita con gli alimenti, la vitamina si libera dai legami con i polipeptidi ai quali è naturalmente combinata e può così legarsi al *fattore intrinseco*, una glicoproteina altamente specifica contenente il 15% di carboidrati, con peso molecolare di circa 50.000 daltons, secreta dalle cellule parietali della mucosa gastrica. L'assorbimento avviene a livello dell'ileo dove esistono recettori altamente specifici per il complesso *fattore intrinseco-vitamina B12* definiti *cubilina*.

Non appena il complesso *fattore intrinseco-cobalamina* attraversa la mucosa dell'ileo, il *fattore intrinseco* è rilasciato e la vitamina è trasferita ad una proteina plasmatica di trasporto, la *transcobalamina II*. Nel plasma e nel fegato esistono altre proteine leganti la cobalamina, come, ad esempio, la *transcobalamina I* che costituisce una vera forma di deposito, una situazione unica per le vitamine idrosolubili. La cobalamina è secreta nella bile e partecipa alla circolazione enteroepatica, per cui il suo fabbisogno dietetico aumenta ogni qualvolta vi sono disturbi di questo sistema.



Dopo essersi legata alla transcobalamina II nel sangue portale, la vitamina scompare dal plasma in poche ore. Il complesso con la transcobalamina raggiunge i tessuti, si lega a specifici recettori di membrana ed entra nelle cellule mediante endocitosi. Nella frazione citoplasmatica solubile (citosol) la vitamina è liberata come idrossicobalamina ed è o convertita a metilcobalamina o entra nei mitocondri dove il cobalto è ridotto e si forma 5'-deossiadenosil cobalamina (Fig. 60.13).

Nell'uomo vi sono solo due reazioni enzimatiche in cui la cobalamina entra come coenzima. La metilazione dell'omocisteina a metionina avviene nel citoplasma ed utilizza la metilcobalamina come coenzima e N<sup>5</sup>-metiltetra-idrofolato come sorgente di metili. L'apoenzima metiltransferasi lega la cobalamina e l'N<sup>5</sup>-metiltetra-idrofolato trasferisce il suo gruppo metilico al gruppo prostetico cobalaminico. Il gruppo metilico è quindi trasferito all'omocisteina, generando metionina. Come si vedrà in seguito, l'assenza di cobalamina esercita un blocco in questa reazione ed un accumulo di N<sup>5</sup>-metiltetraidrofolato.

La seconda reazione enzimatica che utilizza la cobalamina è l'isomerizzazione dell'L-metilmalonil-CoA a succinil-CoA mediante l'enzima L-metilmalonil-CoA mutasi ed il coenzima 5'-deossiadenosilcobalamina. Questa reazione, come la formazione di 5'-deossiadenosilcobalamina dall'ATP e dalla cobalamina ridotta, avviene nei mitocondri.

Negli stati di carenza di vitamina B12 il blocco di queste reazioni enzimatiche darà omocisteinuria e metilmalonilaciduria. L'anemia megaloblastica è probabilmente dovuta ad una secondaria deficienza di folati, conseguenza dell'eccessivo accumulo di N<sup>5</sup>-metiltetraidrofolato. I disordini neurologici associati con il

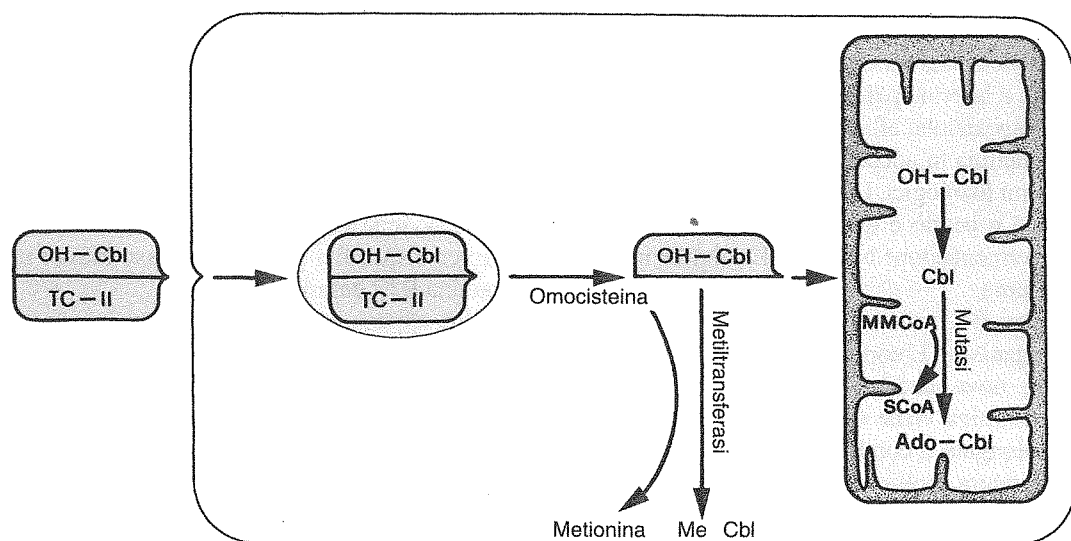
deficit di cobalamina possono essere secondari ad una relativa deficienza di metionina.

Nell'uomo sono stati descritti quattro tipi di malattie ereditarie che coinvolgono il metabolismo della vitamina B12. In due di esse è alterata la sintesi di 5'-deossiadenosilcobalamina solamente, nelle altre due anche quella della metilcobalamina.

**Acido folico.** L'acido folico (\*) (o pteroilglutammico) è il capostipite di un gruppo di molecole naturali strettamente analoghe, definite complessivamente come *folati*. La struttura di base (Fig. 60.14) consiste di tre molecole: anello pteridinico, acido paraminobenzoico (PABA), acido L-glutammico. La combinazione delle prime due costituisce l'acido pterico; i folati sono quindi *pteroilglutamati*.

Le cellule animali non sono capaci di sintetizzare l'acido paraminobenzoico e di attaccare il primo glutamato all'acido pterico. Così, contrariamente ai batteri ed alle piante, gli animali richiedono acido folico nella dieta. La maggior sorgente è la verdura (asparagi, spinaci, broccoli, lattuga, indivia). Vengono poi la frutta (limoni, arance, banane, meloni, nocciole), il fegato, il lievito, i funghi ed il cioccolato.

Nelle piante l'acido folico esiste soprattutto come pteroilptaglutamato, nel fegato come pentaglutamato. Questi peptidi sono resistenti all'idrolisi da parte dei comuni enzimi proteolitici presenti nell'intestino. Essi sono scissi da uno specifico gruppo di enzimi intestinali (folilpoliglutamato idrolasi). Solo la forma monoglutamata è assorbita e la maggior parte è ridotta a tetraidrofolato (H<sub>4</sub> folato) e metilato a N<sup>5</sup>-metil-H<sub>4</sub> fo-



**FIG. 60.13** Schema rappresentante la captazione cellulare e la compartimentalizzazione della cobalamina. OH-Cbl = idrossicobalamina; TC-II = Transcobalamina II; Me-Cbl = Metilcobalamina, Ado-Cbl = 5'-deossiadenosilcobalamina; MMCoA = Metilmalonil Coenzima A; SCoA = succinil coenzima A.

(\*) La parola deriva dal latino *folium* = foglia.

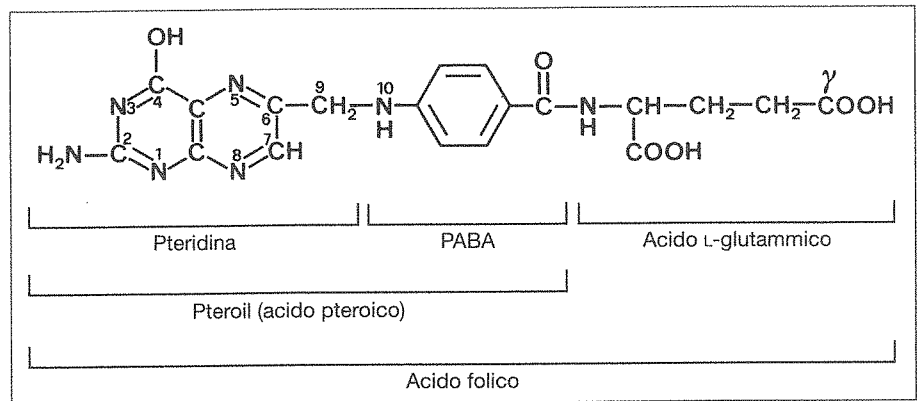


Fig. 60.14 Struttura dell'acido folico.

lato nelle cellule intestinali, come parte integrante del processo di assorbimento. L'assorbimento è alterato nella steatorrea idiopatica, nella sprue tropicale ed in altri disordini intestinali.

Nel plasma circa 2/3 del folato sono legati a proteine. Nella sua forma ridotta, il tetraidrofolato, l'acido folico funge da carrier per singole unità monocarboniose. L'enzima che catalizza la riduzione (Fig. 60.15) è una diidrofolato reduttasi che usa NADPH come donatore di idrogeno (\*). I possibili gruppi monocarboniosi, che sono presenti nei folati e non nell'acido folico, sono interconvertibili metabolicamente. La funzione dei coenzimi folinici è di trasferire unità monocarboniose legate ad uno o ad entrambi gli atomi N<sup>5</sup> e N<sup>10</sup> in reazioni inerenti il metabolismo degli aminoacidi e la sintesi di purine e pirimidine. Ricordiamo in particolare:

- a) conversione dell'acido formico in N10-formiltetraidrofolato;
- b) metabolismo pirimidinico: metilazione della desossuridina monofosfato (dUMP) a timidilato monofosfato (dTMP);
- c) sintesi delle purine: 1. formilazione del glicinamide ribotide; 2. formilazione dell'aminoimidazolo carbossamide ribotide;
- d) metabolismo degli aminoacidi: 1. formazione dell'acido glutamico dall'acido formaminoglutamico; 2. metilazione dell'omocisteina a metionina; 3. interconversione glicina-serina.

**Acido ascorbico.** È importante per parecchi aspetti dell'eritropoiesi. La sua azione come agente riducente favorisce l'assorbimento del ferro. Esso può anche essere coinvolto nel rilasciare il ferro dal tessuto reticoloendoteliale. Non vi sono evidenze che l'acido ascorbico abbia effetti diretti sulla maturazione eritroide.

(\*) Alcuni chemioterapici antitumorali agiscono proprio inibendo questo enzima. Il metatrexate, ad esempio, si lega fortemente ad esso, bloccando la sua attività sull'acido folico. Alcuni farmaci, che inibiscono selettivamente l'enzima solo nei batteri, come il *Trimethoprim*, sono usati come chemioterapici antibatterici.

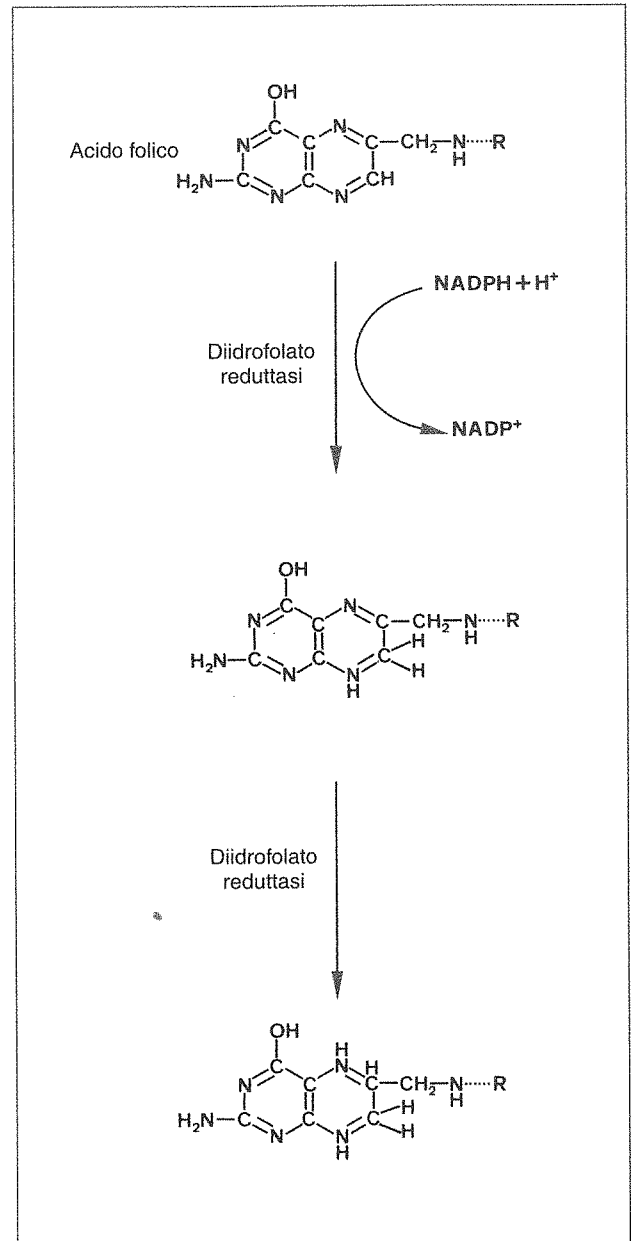


Fig. 60.15 Riduzione dell'acido folico ad acido diidrofolico e di quest'ultimo ad acido tetraidrofolico mediante l'enzima diidrofolato reduttasi.

**Vitamina B<sub>6</sub>.** Il piridossalfosfato è un importante coenzima nella sintesi dell'eme.

**Riboflavina.** Negli stati carenziali di questa vitamina c'è una riduzione della produzione degli eritrociti, ma non è chiaro il ruolo che essa gioca nell'eritropoiesi normale.

**Vitamina E.** È essenziale per il normale metabolismo della membrana eritrocitaria, ma non vi sono prove che essa sia coinvolta nella maturazione degli eritrociti.

**Aminoacidi e proteine.** Sono essenziali per la normale eritropoiesi come precursori di molti costituenti eritrocitari. Una grave carenza proteica riduce la velocità dell'eritropoiesi e nei bambini con grave malnutrizione è stata osservata una ipoplasia eritroide selettiva.

### 60.3.2 Struttura e funzione degli eritrociti

#### ■ Struttura degli eritrociti

Il globulo rosso è una delle cellule più specializzate del nostro organismo. È deputato al trasporto dell'O<sub>2</sub> ai tessuti e della CO<sub>2</sub> agli alveoli polmonari; poiché questo trasporto avviene tramite l'emoglobina, esso ha anche il compito di mantenere la funzionalità di questo componente cellulare.

L'eritrocita è una cellula priva di nucleo, a forma di disco biconcavo (Fig. 60.16) con un diametro medio di

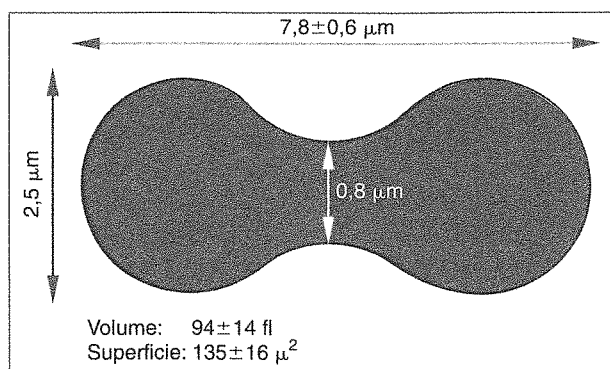


FIG. 60.16 Rappresentazione schematica di un eritrocita.

circa 8 µm, uno spessore di 2,5 µm alla periferia e di 0,8 µm al centro. Il suo volume varia da 85 a 90 femtolitri ed ha una superficie di circa 140 µ<sup>2</sup>. Una sfera di questo volume avrebbe un diametro di circa 5,5 µm ed un'area di 95 µ<sup>2</sup>.

A parità di volume e quindi di contenuto in emoglobina, la maggior superficie ottenibile con questa forma discoidale rispetto alle altre ha notevole importanza in quanto facilita gli scambi gassosi. L'emoglobina (Hb) costituisce il 95% del peso secco delle emazie. Il globulo rosso ha una vita media di circa 120 giorni e durante tale periodo percorre da 300 a 400 km lungo microambienti molto diversi.

In particolare deve passare lungo vasi che hanno un diametro più piccolo del suo (anche solo 3 µm), quindi deve cambiar forma ed adattarsi al tipo di canalizzazione in cui di volta in volta deve scorrere. Pertanto esso dev'essere molto deformabile ed in questa sua caratteristica una parte importante è giocata dalla membrana. Questa permette di controllare l'ambiente interno (anioni, cationi, acqua); la sua faccia esterna, carica negativamente, fornisce le necessarie forze di repulsione richieste per prevenire l'aggregazione cellulare e l'adesione all'endotelio.

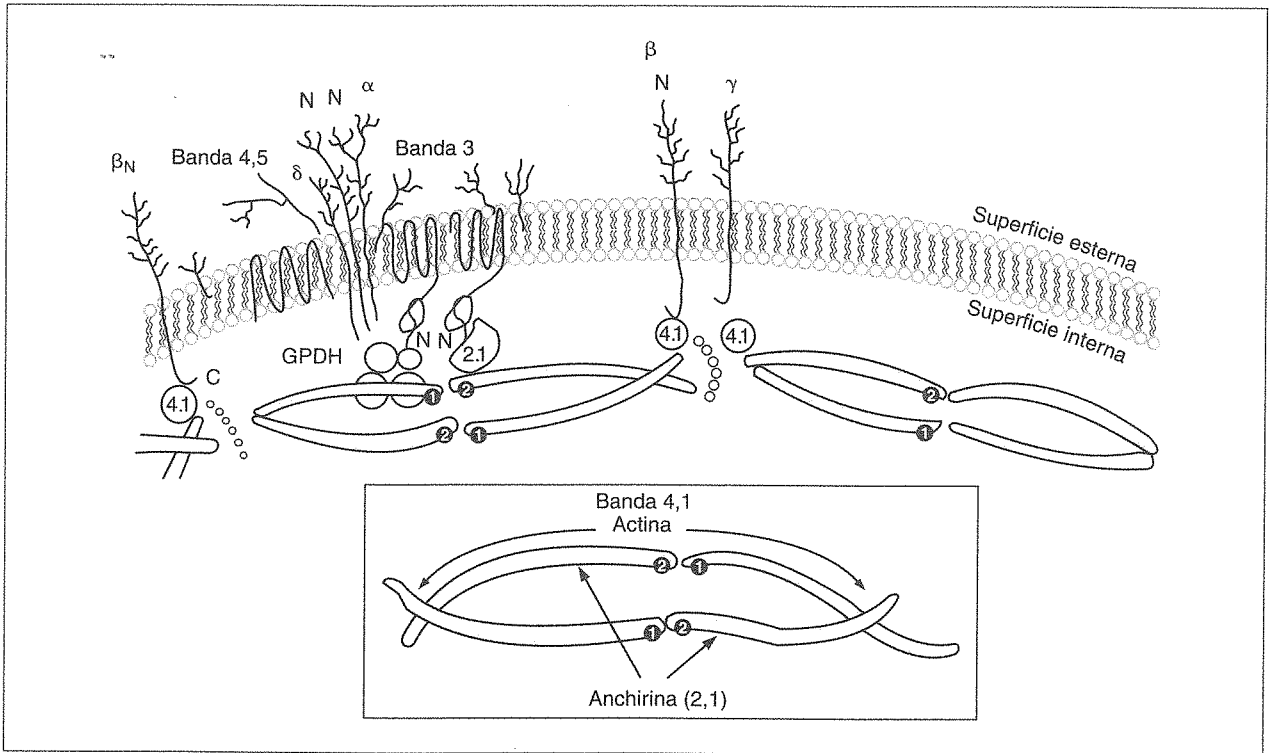
La membrana plasmatica avvolgente l'eritrocita è composta, come le altre membrane cellulari, da un doppio strato lipidico, da proteine e da glicidi; questi ultimi sotto forma di glicoproteine e di glicolipidi costituiscono nel loro insieme il glicocalice, situato sulla faccia esterna di essa, dove forma uno strato idrofilo dallo spessore variabile.

Immediatamente al di sotto della faccia interna della membrana è presente il citoscheletro o membranoscheletro che si estende nel citoplasma. Esso è responsabile delle caratteristiche di robustezza, di flessibilità e di elasticità della membrana e, quindi, delle suddette modificazioni di forma degli eritrociti. Nella tabella 60.6 sono indicate le principali molecole che costituiscono la membrana plasmatica eritrocitaria e la loro distribuzione percentuale.

Un modello di membrana eritrocitaria è schematizzato nella figura 60.17. I fosfolipidi, ed in minore proporzione il colesterolo, formano una struttura a doppio strato in cui sono immerse proteine e glicoproteine.

TAB. 60.6 Composizione della membrana eritrocitaria.

Lipidi (circa 50-60%)	Proteine (circa 40%)	Glicidi (circa 10%)
dei quali (in rapporto al totale)	Proteine periferiche	Sotto forma di:
Acido fosfatidico 1,0%	Proteine integrali	glicolipidi e di glicoprotidi
Fosfatidilcolina 19,0%		
Fosfatidil dietanolamina 18,0%		
Fosfatidilinositoli 1,0%		
Fosfatidilserina 8,0%		
Sfingomielina 18,0%		
Glicosfingolipidi 10,0%		
Colesterolo 25,0%		



**FIG. 60.17** Organizzazione della membrana eritrocitaria. La banda 3, vale a dire la proteina di trasporto anionico, è aggregata in dimeri o anche in forme polimeriche più complesse. Le sialoglicoproteine sono associate con questi polimeri. Gli oligosaccaridi delle glicoproteine sono rappresentati sotto forma di arborizzazioni che partono dalla catena peptidica. L'inserto mostra i siti di interazione del tetramero di spettina con altre strutture.

Questi lipidi, ed in particolare i fosfolipidi, sono molecole anfipatiche, cioè fornite di un'estremità idrofobica e di una idrofila: essendo presenti in un sistema acquoso le estremità idrofobiche confluiscono tra loro in modo da escludere le molecole di acqua, mentre le estremità idrofile tendono anche a reagire tra loro e con l'ambiente acquoso presente sulla superficie esterna e su quella interna delle membrana.

I fosfolipidi di membrana hanno uno "scheletro" costituito da una molecola a tre atomi di carbonio: il glicerolo per i glicerofosfolipidi e la sfingosina per le sfingomieline.

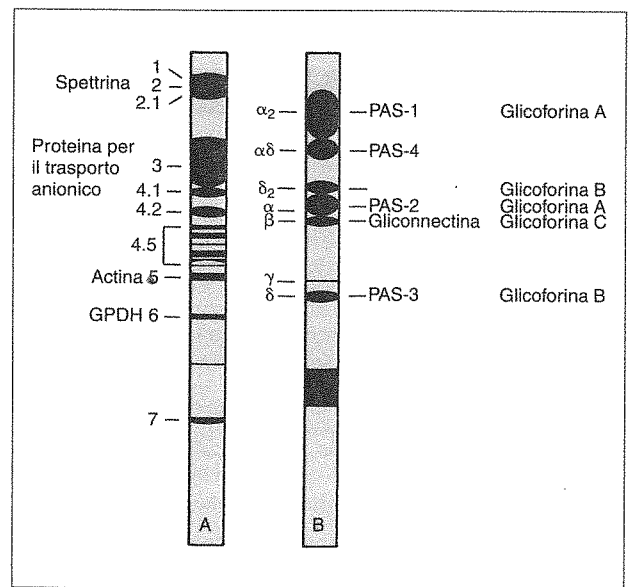
Essi sono disposti asimmetricamente con fosfatidilcolina e sfingomieleina nella parte esterna della membrana e fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina nella parte interna. Nel suo insieme la membrana costituisce una barriera impermeabile all'acqua ed alle molecole idrofile.

I risultati della separazione elettroforetica su gel delle proteine della membrana eritrocitaria sono mostrati nella figura 60.18.

Sotto l'aspetto della loro distribuzione topografica nella membrana, le proteine possono essere distinte in due classi principali: proteine periferiche (o estrinseche) e proteine integrali.

a) **Proteine periferiche o estrinseche**, localizzate alle estremità esterna ed interna della membrana, alla

quale sono debolmente associate per cui risultano facilmente estraibili con soluzioni tampone acquose. Esse sono coinvolte nella formazione di un esteso reticolo sottomembranoso, il citoscheletro o



**FIG. 60.18** Schema di una SDS gel-elettroforesi di proteine di membrana eritrocitaria. A. Colorazione con il Coomassie blu. B. Colorazione con acido periodico Schiff (PAS) per mettere in evidenza le glicoproteine.

membranoscheletro (Tab. 60.7). Mutazioni dei geni che codificano per alcune sono responsabili delle alterazioni di forma dei globuli rossi.

- b) **Proteine integrali**, strettamente integrate ai fosfolipidi con legami anche di tipo covalente, sono presenti nel doppio strato lipidico ed estraibili con metodi drastici, cioè con l'impiego di detergenti; alcune tra esse sono presenti solo durante il processo maturativo della serie eritroide.

Esse sono definite transmembranacee perché con la loro porzione idrofobica attraversano tutto lo spessore della membrana come tali o formando un certo numero di espansioni. Non sono molecole fisse in quanto possono fluire nel contesto del doppio strato lipidico.

Le proteine integrali della membrana eritrocitaria, tra cui le più importanti sono quelle della banda 3 e le glicoforine, oltre ad esercitare una funzione di ancoraggio tra il membranoscheletro e la membrana, esercitano moltissime funzioni, per cui sotto questo aspetto possono essere distinte, a seconda della principale funzione da esse svolta, in:

- a) **Proteine canale**, quali quelle della banda 3 adibite al trasporto attraverso la membrana di specifiche molecole, quali ad es. le acquaporine (AQP 1 e 3) per lo scambio dell'acqua, i canali per lo scambio di alcuni anioni ( $\text{Cl}^-$  e  $\text{HCO}_3^-$ ), essenziale per il mantenimento dell'equilibrio elettrolitico, la proteina adibita a trasporto dell'urea, proteine per il trasporto di ammonio associate agli antigeni Rh. Alcune di esse funzionano anche da molecole di ancoraggio con le proteine del citoscheletro, altre da recettori per microrganismi.

- b) **Proteine di trasporto**, che legandosi ad un'altra molecola (ad es.  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) ne consentono il passaggio attraverso la membrana. Ad es.: la pompa calcio magnesio-ATPasi, che media l'afflusso del calcio contro un gradiente di concentrazione 50-200 volte più alto, con conversione di una molecola di ATP in quella di ADP ogni due molecole di calcio espulse; la pompa  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasi, che è coinvolta nell'espulsione del  $\text{Na}^+$  e nell'entrata del  $\text{K}^+$ . Si ricorda che il  $\text{Na}^+$  è pompato fuori attivamente contro un gradiente di concentrazione (10 mEq/L all'interno contro 145/L nel plasma), mentre il  $\text{K}^+$  è pompato invece all'interno (4,5 mEq/L nel plasma contro 100 mEq/L nella cellula).

- c) **Proteine di riconoscimento cellulare**, in particolare glicoproteine, quali ad es. quelle costituenti i gruppi sanguigni.

- d) **Proteine recettoriali**, per ormoni, per chemochine (Duffy Antigen Receptor for chemokines), per batteri, virus e per parassiti.

- e) **Proteine enzimatiche**, quali alcune glicosiltransferasi e le proteine del gruppo Kelly, attive come metalloproteasi.

- f) **Proteine di adesione**, quali ad es. quelle che riconoscono molecole presenti sulla superficie degli endoteli. Tra le più importanti si ricordano CD44, CD47, CD108, CD147, CD239, CD242.

#### ■ Metabolismo energetico degli eritrociti

Gli eritrociti durante il ciclo maturativo perdono i mitocondri e conseguentemente la possibilità di ricavare dai processi ossidoriduttivi energia, della quale essi hanno assoluta necessità sia per l'attività dei vari mec-

Tab. 60.7 Principali proteine periferiche della membrana eritrocitaria.

Proteine	Caratteristiche
Spectrina (banda 1 e 2)	Proteina fibrosa che prende contatto con la porzione proteica integrale della membrana e che rappresenta il 30% circa di tutte le proteine membranacee, È un dimero, costituito da due catene polipeptidiche, la $\alpha$ con p.m. 220 Da e la $\beta$ con p.m. 240.000 Da, le quali, si associano con un altro complesso $\alpha$ - $\beta$ formando un tetramero. I tetrameri sono riuniti tra loro da molecole di actina e di proteina della banda 4.1 e possiedono anche siti di legame con l'anchirina. Si forma in tal maniera una rete di complessi molto stabili.
Actina (banda 5)	È un monomero che si associa ad altri monomeri formando complessi oligomerici filamentosi. Presiede soprattutto alla formazione e stabilizzazione dei complessi tetramerici di spectrina. Stimola l'attività ATPasica della miosina.
Anchirina (banda 2.1)	È una proteina di notevoli dimensioni che insieme alla proteina della banda 4.1 connette la rete di spectrina alla superficie interna della membrana plasmatica.
Proteina della banda 4.1	È presente in due isoforme e contribuisce all'ancoraggio della rete di spectrina alla superficie interna della membrana, disponendosi all'estremità dei tetrameri.
Proteina della banda 4,9	È coinvolta alla oligomerizzazione dell'actina.
Tropomiosina eritrocitaria	È una proteina bicatenaria che interagisce con l'actina stabilizzandola.
Adductina	Ha una struttura bicatenaria e contribuisce alla formazione della rete di spectrina.
Miosina eritrocitaria	È simile alla miosina muscolare e come questa possiede attività contrattile producendo le modificazioni di forma degli eritrociti.

canismi di pompa che per lo svolgimento delle reazioni ossidoriduttive necessarie per proteggere l'emoglobina e la membrana dai danni inflitti dai processi ossidativi.

Il glucosio, che è per gli eritrociti maturi l'unica sorgente di energia, viene metabolizzato attraverso la via di *Embden-Meyerhof* nel corso della quale da una molecola di glucosio si ricavano ATP, NAD e NADH e 2,3DPG (2,3-difosfoglicerato) con produzione finale di lattato. L'altra via di metabolizzazione del glucosio è quella dei pentosi fosfati che consente anche di ricavare buona parte del NADPH.

La figura 60.19 schematizza la via di Embden-Meyerhof (per la cui dettagliata descrizione si rimanda ai libri di Biochimica) ed indica lo shunt di Rapoport-Luebering in cui si ha la formazione del 2,3-difosfoglicerato (2,3DPG) come prodotto intermedio nella reazione di trasformazione dell'1,3DPG a 3DPG.

Le funzioni metaboliche degli eritrociti possono essere sommarizzate come segue:

a) **Mantenimento dell'omeostasi osmotica** attraverso l'attività delle pompe di membrana. Questa funzione di trasporto è mediata dall'energia prodotta

dall'ATP, ed è necessaria per impedire modificazioni di volume, di forma e di flessibilità della cellula. Attraverso la membrana eritrocitaria si svolge un continuo movimento degli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , sostenuto da una pompa dotata da attività ATPasica, che utilizza una molecola di ATP per esportare tre ioni sodio ed importarne due di potassio.

b) **Sintesi di NAD** (nicotinamide adenina dinucleotide) e produzione da esso di NADP per aggiunta di un gruppo fosfato esterificato al gruppo ossidrilico del carbonio 2' dell'adenosina.

c) **Utilizzo di due principali sistemi ossidoriduttivi**, dei quali il primo impiega il NADH, che mantiene il ferro dell'emoglobina allo stato ridotto, ed il secondo, mediato dal NADPH, mantiene il glutatiione allo stato ridotto e protegge i gruppi sulfidrilici dell'emoglobina e delle proteine di membrana.

– Per quanto riguarda il **mantenimento del ferro dell'emoglobina allo stato ridotto**, si ricorda che l'enzima che riduce, a spese del NADH, generato dalla gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, è la metaemoglobina reduttasi (Fig. 60.19) che riduce l'emoglobina ossidata, contenente nel gruppo eme  $\text{Fe}^{3+}$ , ed incapace a legare l'ossigeno, ad emoglobina ridotta funzionalmente attiva, nel cui gruppo eme il ferro è presente come  $\text{Fe}^{2+}$ .

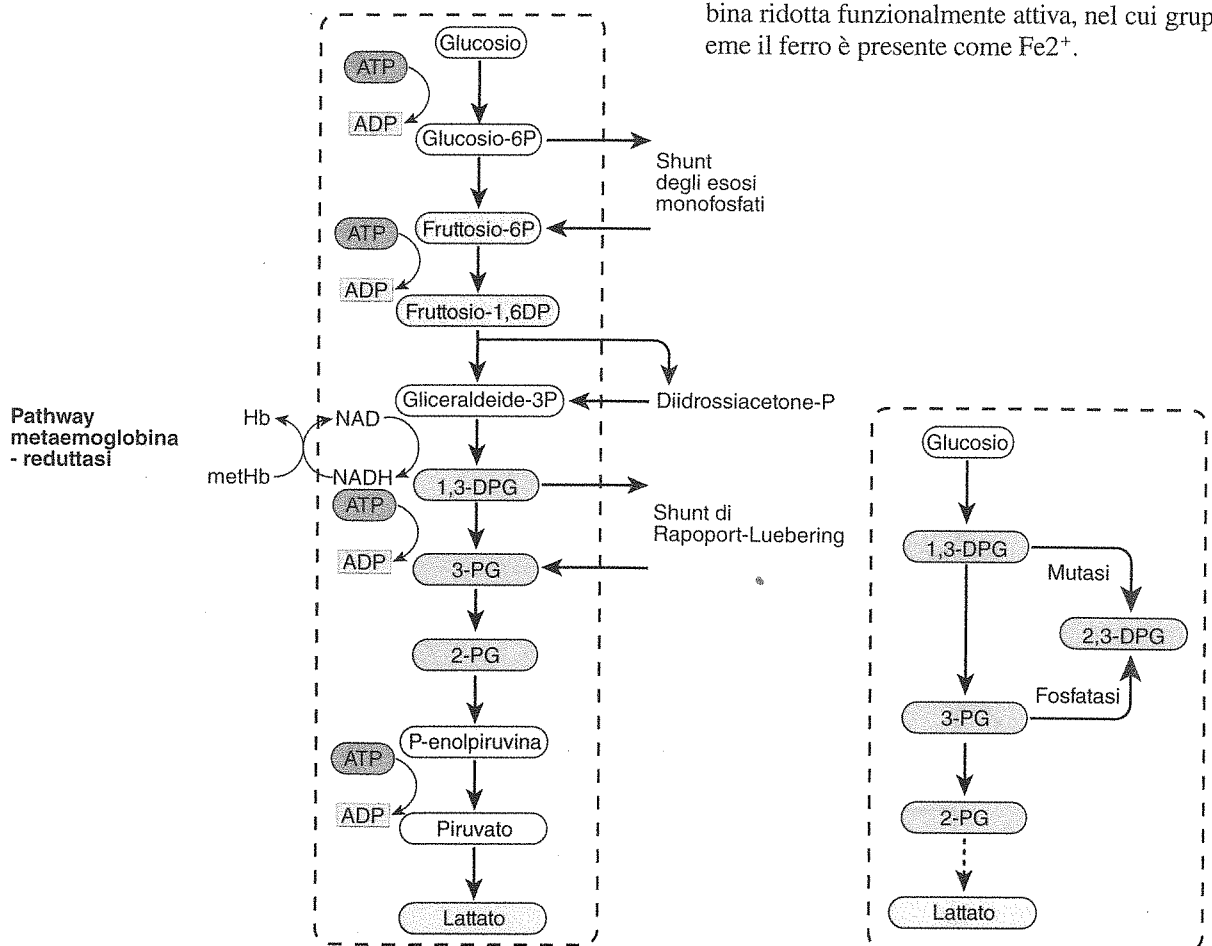


FIG. 60.19 Tappe della via di Embden-Meyerhof e dello shunt di Rapoport-Luebering.

- Per quanto riguarda il *mantenimento del glutazione allo stato ridotto*, si ricorda che questo sistema dipende dal NADPH, generato dal NAD nel ciclo dei pentosi fosfati, e dagli enzimi glucosio-6 fosfato deidrogenasi e fosfogluconato deidrogenasi.
- d) *Produzione del 2,3 DPG*, un metabolita intermedio della via glicolitica che funziona da modulatore dell'attività dell'emoglobina della quale regola l'affinità con l'ossigeno (vedi Figg. 60.19 e 60.27).

Ogni alterazione di queste funzioni metaboliche critiche causa anormale funzione dell'emoglobina.

### 60.3.3 Struttura, funzione e sintesi dell'emoglobina

Tutte le emoglobine umane hanno una struttura di base simile. Esse sono formate da due differenti paia di catene peptidiche, a ciascuna delle quali è attaccato un gruppo prostetico eme, composto di protoporfirina e ferro e situato in un recesso di ciascuna delle catene, noto come *tasca dell'eme*. L'ancoraggio avviene da una parte mediante legami che interessano le catene laterali dell'acido propionico dell'eme e la globina, dall'altra tramite il ferro che dispone di due valenze libere: una lo fissa direttamente alla globina su un residuo istidinico detto "prossimale", l'altra agisce sulla faccia opposta dell'eme fissando una molecola di ossigeno e per suo tramite assicura un ancoraggio supplementare su un altro residuo istidinico della globina, detto "distale" (Figg. 60.20 e 60.21).

Le quattro catene dell'emoglobina (Hb) costituiscono la parte proteica (globina). Esistono sei tipi di cate-

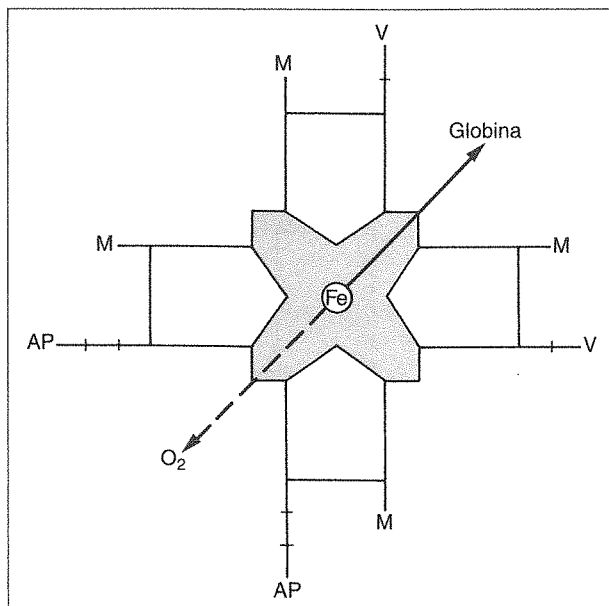


FIG. 60.20 La molecola dell'eme. AP = Acido propionico; M = Metile; V = Vinile.

TAB. 60.8 Tipi di emoglobina umana normali.

	Denominazione	Struttura	Quantità nell'adulto (%)	Quantità nel neonato (%)
Adulto	Hb A	$\alpha_2\beta_2$	97	20
	Hb A2	$\alpha_2\delta_2$	2,5	0,5
Feto*	Hb F	$\alpha_2\gamma_2$ $\alpha_2\gamma_2^{75T}$ $\alpha_2\gamma_2^{136gli}$ $\alpha_2\gamma_2^{136ala}$	0,5	80
Embrione	Hb Portiand	$\zeta_2\gamma_2$		
	Hb Gower 1	$\zeta_2\varepsilon_2$		
	Hb Gower 2	$\alpha_2\varepsilon_2$		

\* Hb F contiene vari tipi di catene  $\gamma$ , una con glicina e l'altra con alanina in posizione 136, prodotti da distinti loci genetici; un'altra è in posizione 75 dove, al posto dell'isoleucina, può esservi la treonina.

ne, denominate  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$ ,  $\zeta$ . Le prime quattro sono quelle che si ritrovano nei diversi tipi di Hb della vita extrauterina, mentre le ultime due sono presenti solo nell'embrione e nel feto (Tab. 60.8).

La catena  $\alpha$  è composta da 141 aminoacidi, la  $\delta$  da 146, la  $\beta$  da 146 con soli 10 aminoacidi diversi dalla precedente, la  $\gamma$  anche da 146 con 36 aminoacidi diversi da  $\beta$ . Di quest'ultima ne esistono due varietà che si differenziano per 1 aminoacido in posizione 136: glicina in una ( $G_\gamma$ ) ed alanina nell'altra ( $A_\gamma$ ). Una terza varietà è caratterizzata dalla presenza in posizione 75 di treonina ( $T_\gamma$ ) al posto dell'isoleucina. Le catene della globina si riuniscono tra loro mediante vari legami (Fig. 60.22). I legami  $\alpha_1\beta_2$  e  $\alpha_2\beta_1$ , sono relativamente poco numerosi (contatti tra 19 aminoacidi) mentre i legami  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_2\beta_2$  sono più forti (35 aminoacidi).

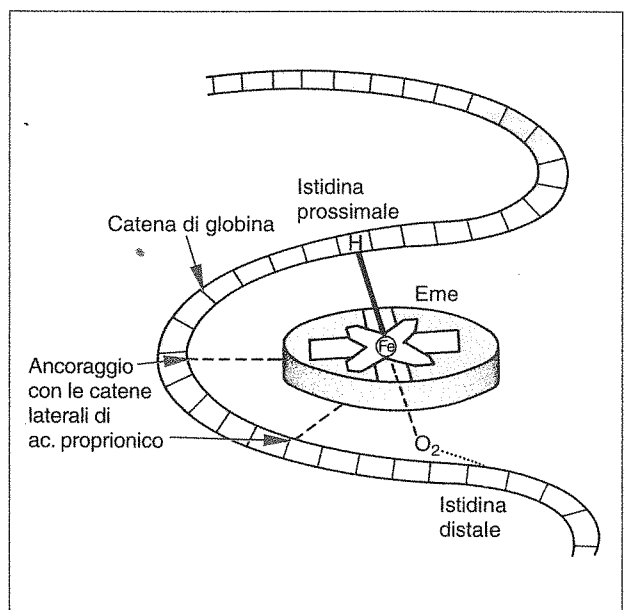
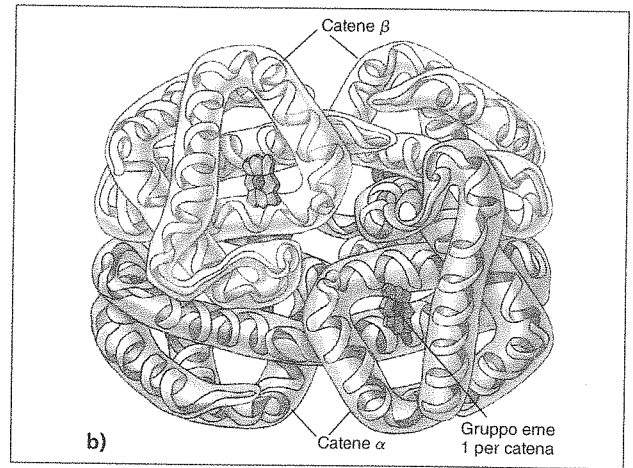
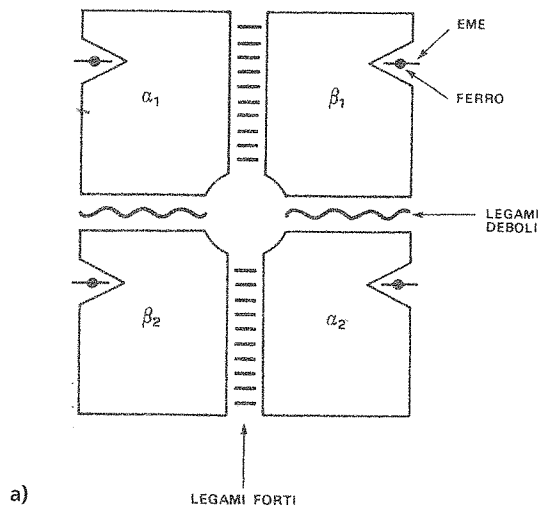


FIG. 60.21 I legami eme-globina.



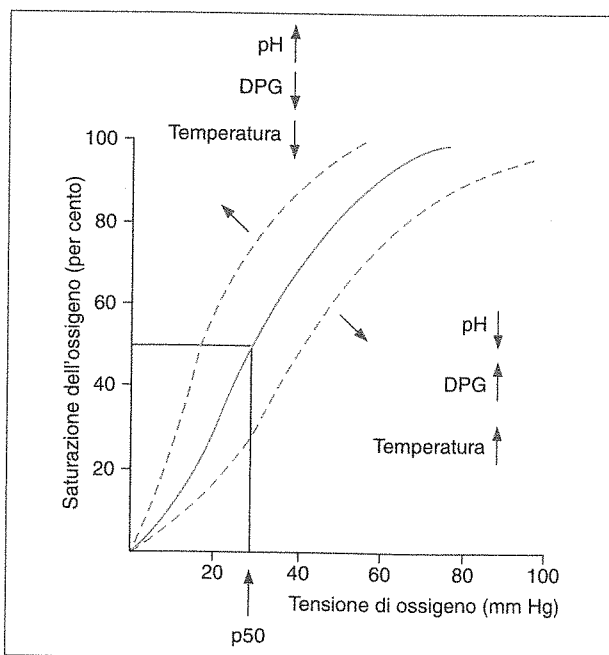
**FIG. 60.22** Disegno schematico illustrante la struttura dell'emoglobina A. A sinistra, le quattro catene globiniche, in ognuna delle quali sono evidenziati i siti leganti i gruppi eme. A destra, modello tridimensionale della molecola.

Le catene polipeptidiche dell'emoglobina possono subire alcune modificazioni posttrascrizionali. Di particolare interesse è quella a cui può essere sottoposta l'Hb A: la valina N terminale delle catene  $\beta$  può essere coniugata con glucosio mediante una base di Schiff dando origine ad emoglobina glicata (Hb A<sub>1c</sub>). Questo si ha soprattutto nei diabetici ed è proporzionale ai livelli di glicemia. L'Hb A<sub>1c</sub> rappresenta pertanto un indice della glicemia media di periodi pregressi ed è utile nel controllo dei diabetici.

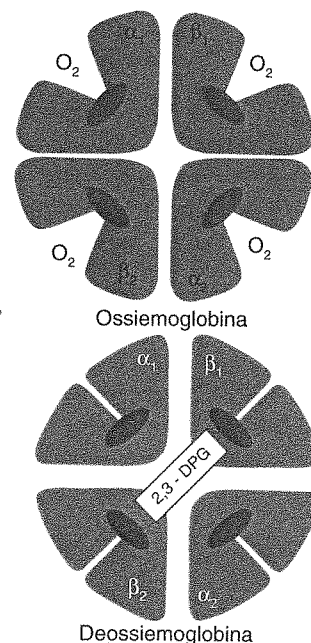
La **curva di ossigenazione** dell'emoglobina in funzione della tensione di ossigeno ha una caratteristica forma sigmoide (Fig. 60.23). Essa mette in relazione il

percento di saturazione con la tensione di ossigeno. Un indice utile per indicare l'affinità dell'ossigeno è il p50 che rappresenta la pressione parziale di ossigeno a cui l'emoglobina è saturata al 50%. La forma sigmoide della curva è indice di cooperatività (allosterismo positivo) tra le subunità: quando un gruppo eme lega l'ossigeno, l'affinità per il gas degli altri eme del tetramero aumenta.

Questo fenomeno è la conseguenza del fatto che l'emoglobina può esistere in una forma deossi (o anche T da tense) ed in un forma ossi (o R da relaxed) in quanto essa subisce modificazioni spaziali in relazione alla fissazione ed alla cessione dell'ossigeno. Come indicato nella figura 60.24, le catene globiniche sono nell'os-



**FIG. 60.23** Curva di dissociazione dell'ossigeno. I fattori che spostano la curva a destra o a sinistra sono indicati nel grafico insieme alla posizione del normale valore della p50.



**FIG. 60.24** Ossiemoglobina (Relaxed State) e deossiemoglobina (Tense State).  $\alpha$  e  $\beta$  = catene globiniche; 2,3-DPG = 2,3-Difosfoglicerato.

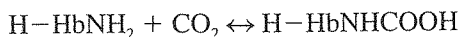


siemoglobina a stretto contatto tra loro, cioè rilasciate (R), mentre nella deossioglobina (che ha ceduto l'O<sub>2</sub>) esse si contraggono e tendendosi (T) si scostano tra loro, venendo in tal modo a creare uno spazio in cui penetra il 2,3-diglicerosfosfato (2,3 DPG), un composto che si forma nel corso del ciclo di Embden-Meyerhof (vedi Fig. 60.19). La forma T ha un'affinità per l'ossigeno più bassa della R. Man mano che l'ossigeno si lega ai quattro gruppi eme, l'emoglobina T si trasforma in emoglobina R e l'affinità per l'O<sub>2</sub> aumenta. Difatti, il legame del 2,3 DPG alle 2 catene  $\beta$  della Hb deossigenata viene spezzato durante il passaggio degli eritrociti nei capillari degli alveoli polmonari nel momento in cui essa forma un legame l'O<sub>2</sub> e si lega ai quattro gruppi eme. La contrazione ed il rilassamento della molecola emoglobinica sono pertanto responsabili della forma sigmoide che assume la curva di dissociazione dell'O<sub>2</sub> dalla Hb. Da notare che i suddetti movimenti possono compiersi in maniera ottimale soltanto quando la struttura delle catene globiniche è normale.

Un'altra importante proprietà funzionale dell'emoglobina è l'**effetto Bohr**, cioè la diminuzione dell'affinità dell'ossigeno con l'aumentare della tensione di CO<sub>2</sub>. Questo fenomeno è pH dipendente ed offre il vantaggio fisiologico di facilitare la cessione di ossigeno a livello tissutale: un abbassamento del pH dovuto alla CO<sub>2</sub> (e quindi all'aumento di acido carbonico), determinando riduzione dell'affinità dell'ossigeno, ne fa aumentare il rilascio.

La CO<sub>2</sub> influenza l'Hb in due modi:

- CO<sub>2</sub> diffonde negli eritrociti, dove l'anidrasi carbonica produce acido carbonico, riduce il pH e causa l'effetto Bohr.
- La CO<sub>2</sub> si combina con gli aminogruppi terminali della deossioglobina secondo la seguente reazione:



con la formazione di carbaminoemoglobina, che ha un'affinità per l'ossigeno più bassa. Inoltre la deossioglobina forma carbaminocomplessi più rapidamente di quanto faccia l'ossioglobina.

Il valore di p50 può essere spostato a destra o a sinistra nella curva di dissociazione in vari modi:

- variando il pH e la concentrazione di CO<sub>2</sub> con il meccanismo che abbiamo appena descritto,
- con il 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). Il 2,3-DPG può inserirsi tra due catene  $\beta$  quando lo spazio tra di loro diventa maggiore (durante la deossigenazione) ed interagire con parecchi siti specifici nella parte centrale della molecola. Nella conformazione ossi lo spazio tra le catene  $\beta$  si restringe ed il 2,3-DPG non può passare. Come conseguenza si ha che, aumentando la concentrazione di 2,3-DPG, più molecole sono mantenute nella configurazione deossi e la curva di dissociazione dell'ossigeno è spostata a destra. Questa interazione ha importanti implicazioni cliniche.

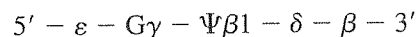
## ■ Metaemoglobina e carbossiemoglobina

L'ossidazione del ferro dell'Hb da Fe<sup>2+</sup> a Fe<sup>3+</sup> determina la formazione della metaemoglobina. Quando i suoi valori superano 1,5 g/L si ha cianosi. Questo può essere la conseguenza di un disordine determinato geneticamente o dell'esposizione delle cellule normali a severi stress ossidanti. La forma congenita è dovuta o ad un deficit di *metaemoglobina reductasi NADH-dipendente* o ad una sostituzione di aminoacidi nelle catene  $\beta$  e  $\alpha$  vicino al sito di attacco dell'eme. Queste varianti di emoglobina sono dette Hb M. La forma acquisita è la conseguenza dell'esposizione ad ossidanti come i nitriti, nitrati, alcuni farmaci, derivati dell'anilina.

La carbossiemoglobina deriva dall'esposizione a CO. L'affinità dell'eme per il CO è 200 volte maggiore che per l'ossigeno. Il difetto funzionale dell'emoglobina è simile nelle due condizioni: una certa proporzione della molecola di eme è incapace di legare ossigeno. A causa del meccanismo di interazione eme-eme, le molecole di Hb con eme alterato rimangono nella configurazione ossi, vale a dire c'è uno spostamento a sinistra della curva di dissociazione. La presenza di 30% metaemoglobina o carbossiemoglobina è molto più grave di una pari riduzione dell'ematocrito, poiché ciascun tetramero di emoglobina, anche con un solo eme ossidato, è fisiologicamente inutile. Il risultato è una grave ipossia tissutale.

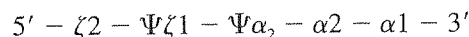
## ■ Controllo genetico della sintesi di emoglobina

La struttura delle differenti emoglobine è determinata da un gruppo di specifici geni strutturali. I geni della catena  $\alpha$  sono sul cromosoma 16, gli altri sul cromosoma 11 (Fig. 60.25). Parti di queste regioni del genoma sono state clonate e la loro struttura è stata analizzata in dettaglio (Fig. 60.26). Il gruppo dei geni globinici non  $\alpha$  sul cromosoma 11 è contenuto approssimativamente in 60 Kb. I geni sono disposti nel seguente ordine:



Il locus  $\Psi\beta 1$  è uno pseudogene, cioè un locus che ha somiglianze strutturali con il  $\beta$  locus, ma che ha subito mutazioni che impediscono la sua normale trascrizione; pseudogeni di questo tipo sono probabilmente residui evolutivi di loci genetici una volta attivi.

I geni della porzione globinica  $\alpha$  si trovano sul cromosoma 16 nell'ordine:



$\Psi\zeta 1$  e  $\Psi\alpha_2$  sono pseudogeni. Tutti i geni globinici hanno una struttura simile: regioni codificanti (esoni) separate da sequenze non codificanti (introni). All'estremità 5' (upstream) vi sono blocchi di sequenze omologhe coinvolti nell'inizio della trascrizione, e perciò rappresentano sequenze di promotori.

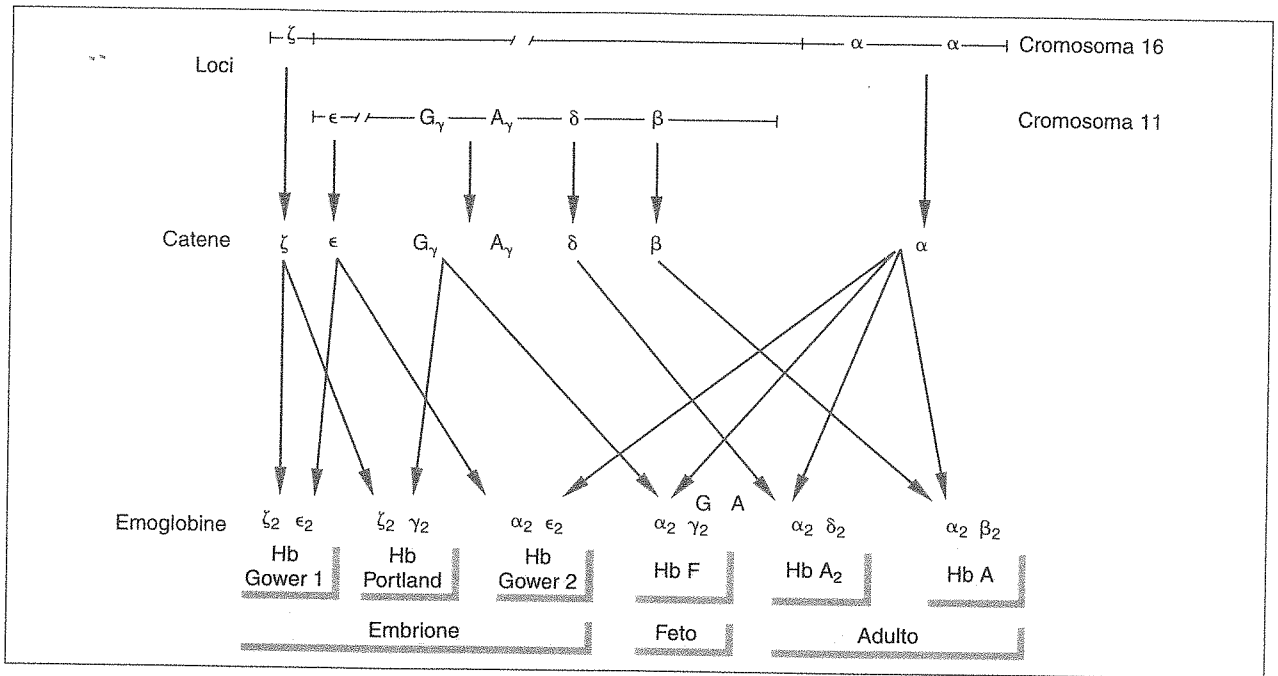


FIG. 60.25 Controllo genetico della sintesi delle emoglobine umane in vari stadi di sviluppo.

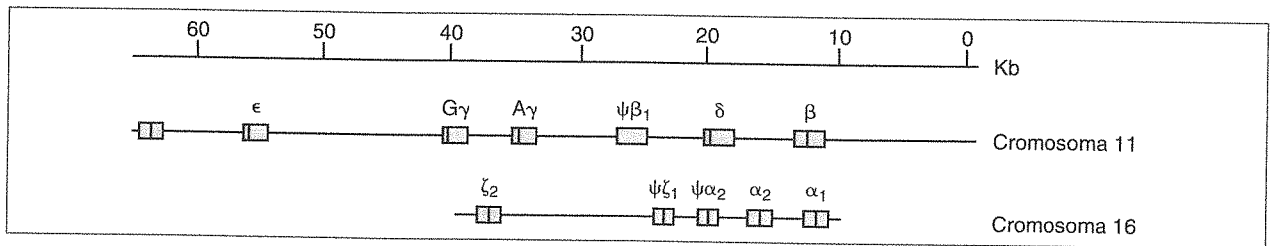


FIG. 60.26 Posizioni dei geni della globina sui cromosomi 16 e 11. I geni indicati con Ψ sono pseudogeni, cioè hanno sequenze simili a geni funzionali ma hanno mutazioni che ne impediscono il funzionamento. Si suppone che siano i residui evolutivi di geni un tempo attivi. Kb = Kilobasi = 1000 basi nucleotidiche.

I trascritti primari dei geni della globina sono grandi molecole di mRNA che contengono sia gli introni che gli esoni. Prima di passare nel citoplasma, gli introni sono rimossi e gli esoni formano l'mRNA definitivo della globina. Una volta nel citoplasma dei precursori degli eritrociti, l'mRNA agisce come stampo per la sintesi delle catene della globina. Ciascuna catena si combina con un eme e, infine, le varie subunità si combinano per formare le molecole di emoglobina definitive.

■ **Modificazioni durante lo sviluppo**

Durante lo sviluppo c'è un'attivazione sequenziale dei geni della globina embrionale, fetale ed adulta. La sintesi delle catene della globina embrionale cessa circa all'ottava settimana di sviluppo. La produzione di emoglobina fetale continua fino a poche settimane prima della nascita, dopo di che prende l'avvio la sintesi dell'emoglobina adulta ed alla fine del primo anno di vita si producono solo tracce di Hb F. La sintesi di catene β è molto bassa all'inizio della vita intrauterina e durante le prime fasi della vita fetale rappresenta circa il 10%

delle catene globiniche di tipo non-α. L'emoglobina F interagisce molto poco con il 2,3-DPG per cui l'affinità per l'ossigeno del sangue fetale è più elevata di quella dell'adulto. Questa è un'importante funzione adattativa per l'ossigenazione del feto. Il meccanismo che regola il ben coordinato spostamento dalla Hb embrionale a quella fetale, e da questa a quella adulta, non è noto.

**60.3.4 Distruzione degli eritrociti (emocateresi)**

La morte del globulo rosso avviene di solito per senescenza; in condizioni patologiche (per esempio nelle anemie emolitiche) la sua distruzione può avvenire a caso, indipendentemente dall'età. Con la perdita del nucleo e dei ribosomi negli ultimi stadi della maturazione, l'eritrocito diviene incapace di sintetizzare proteine. La progressiva perdita del patrimonio enzimatico non può essere colmata con la sintesi di nuovi enzimi e questo provoca deterioramento dei processi metabolici. Si crede che l'invecchiamento sia dipendente da

alterazioni del ciclo glicolitico, con diminuzione della disponibilità di ATP; da alterazioni delle membrane, consecutive al difetto energetico e tali da ridurre la deformabilità; da alterazioni dei meccanismi che proteggono l'Hb dall'ossidazione. A seguito di queste modificazioni il globulo rosso va incontro a frammentazione nel microcircolo e/o a rigonfiamento con aumento della sua fragilità; infine la cellula alterata viene fagocitata dai macrofagi splenici ed epatici.

## 60.4 Anemie

Nella pratica clinica le anemie sono definite come una riduzione della concentrazione dell'emoglobina circolante o del numero dei globuli rossi al di sotto dei valori normali per un dato individuo. Quando si fa una diagnosi di anemia bisogna infatti considerare che c'è una notevole variazione individuale nei valori dell'ematocrito, della concentrazione di emoglobina e del numero dei globuli rossi e che una riduzione dell'ematocrito può essere dovuta anche ad un aumento del volume plasmatico. Perciò è importante distinguere l'anemia vera da quella relativa dovuta ad emodiluizione.

Sebbene di grande valore pratico, la definizione di anemia sulla base dei valori dell'ematocrito o della concentrazione dell'emoglobina ha molte limitazioni dal punto di vista della fisiopatologia. Dato che la funzione degli eritrociti è quella di trasportare ossigeno ai tessuti, meglio è definire l'anemia come quella condizione in cui la massa degli eritrociti circolanti è insufficiente a soddisfare la richiesta di ossigeno ai tessuti. Questa definizione tiene conto del fatto che vi sono molti modi in cui l'organismo può compensare l'anemia e che in ogni singolo paziente è importante misurare non solo l'ematocrito, ma anche i meccanismi compensatori che sono al lavoro per superare gli effetti negativi della ridotta massa degli eritrociti.

### 60.4.1 Meccanismi di adattamento all'anemia

La massa totale degli eritrociti deve fornire ai tessuti circa 250 ml di ossigeno al minuto. La normale capacità di trasportare ossigeno è di 20 ml/100 ml di sangue. Con una gittata cardiaca di 5.000 ml/min, sono forniti ai tessuti 1.000 ml di ossigeno. L'estrazione di 1/4 di O<sub>2</sub> riduce la tensione di questo da 100 mm Hg nella porzione arteriosa terminale dell'ansa capillare a 40 mm Hg nella porzione venosa. Nell'anemia l'estrazione della stessa quantità di ossigeno porterebbe ad una maggiore desaturazione dell'emoglobina e ad una più bassa tensione del gas all'estremità venosa del capillare. Per impedire che questo avvenga intervengono **meccanismi compensatori**. Essi possono essere di tipo centrale o periferico.

La principale compensazione è l'aumento della gittata cardiaca. Essa non si modifica fintanto che la con-

centrazione di Hb non scende al di sotto di 7-8 g/dl. La gittata allora aumenta in modo proporzionale alla diminuzione di emoglobina fino anche a 4-5 volte i valori normali. A causa dell'anemia, la viscosità del sangue diminuisce ed aumenta la velocità di circolo. La pressione sistolica di solito si mantiene su buoni valori, ma la diastolica diminuisce, per cui il carico di lavoro sui ventricoli è solo leggermente aumentato. All'andamento della gittata cardiaca si associano l'aumento della frequenza cardiaca e di quella respiratoria.

Il sangue nelle coronarie è già insaturo in condizioni di riposo per cui ogni aumento della richiesta di ossigeno da parte del miocardio deve derivare da aumento del flusso piuttosto che da incremento dell'estrazione di ossigeno. Questo è il motivo per cui, in presenza di coronaropatie, l'anemia talvolta causa angina.

Il midollo osseo incrementa l'eritropoiesi, per azione dell'eritropoietina (EPO), la cui sintesi è stimolata dall'ipossia. È stato dimostrato che già dopo un paio di ore dal momento in cui si verifica la caduta della pO<sub>2</sub> tissutale, si verifica nelle cellule dell'apparato juxtaglomerulare del rene un aumento della trascrizione dello mRNA per la EPO, in conseguenza dello stimolo esercitato dall'Hypoxia Inducible Factor (HIF-1). Mentre in condizioni fisiologiche HIF-1 esercita la sua azione sulle HIF Responsive Elements del gene che codifica per la EPO in maniera molto rapida perché viene ubiquitinato, in condizioni ipossiemiche sfugge alla ubiquitinazione perché viene inibita la HIF-prolil-idrossilasi. Questo enzima, difatti, rende HIF suscettibile all'ubiquitinazione idrossilando la sua subunità  $\alpha$ . Pertanto quando questo enzima è privato della sua attività, HIF ha la possibilità di esercitare più a lungo la sua azione trascrizionale. Meccanismi compensatori derivano anche dai tessuti. C'è una redistribuzione del sangue fra i tessuti: da quelli, come la cute, che richiedono poco ossigeno, a quelli, come il miocardio ed il cervello, molto più dipendenti. Questo si manifesta con vasocostrizione cutanea.

A livello eritrocitario la modificazione più eclatante è lo spostamento a destra della curva di dissociazione dell'ossigeno e questo permette l'estrazione di un' aumentata quantità di gas. Lo spostamento è dovuto essenzialmente ad un incremento della produzione di 2,3-DPG. Infatti crescendo la concentrazione di deossiemoglobina, più 2,3-DPG è legato. La caduta di DPG porta ad una riduzione dell'inibizione da feedback della difosfogliceromutasi e più 2,3-DPG è formato attraverso lo shunt di Rapoport-Luebering (\*) (Fig. 60.27).

(\*) Nel ciclo di Embden-Meyerof c'è una via collaterale chiamata shunt di Rapoport-Luebering, in cui la formazione di 3-fosfoglicerato dall'1,3-difosfoglicerato avviene non direttamente attraverso l'azione della fosfoglicerato-chinasi, ma per azione della 2,3-DPG mutasi. Il 2,3-DPG esercita un meccanismo di feedback negativo sulla 2,3-DPG mutasi (vedi Fig. 60.19).

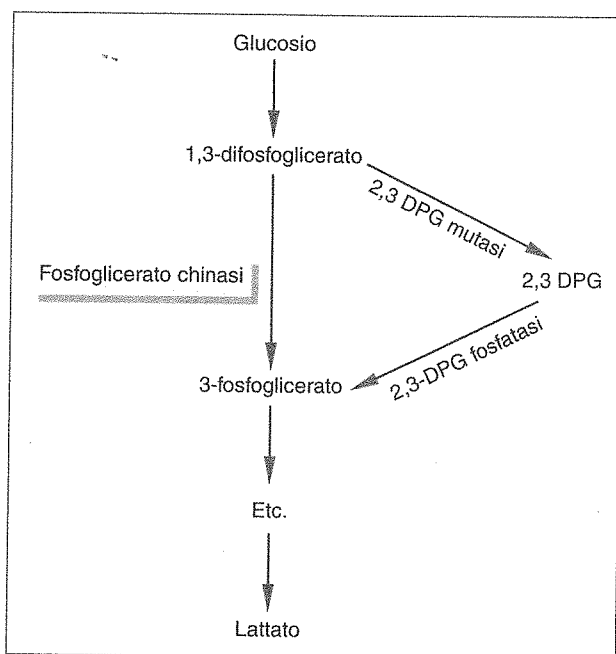


FIG. 60.27 Shunt di Rapoport-Luebering.

Questo tipo di meccanismo compensatorio ha comunque i suoi limiti. Per esempio, alcune emoglobine (come la Hb F) non interagiscono con il 2,3-DPG. In certi difetti enzimatici degli eritrociti c'è una sintesi ridotta di 2,3-DPG, mentre in altri, come nel deficit di piruvatochinasi, i livelli di 2,3-DPG sono aumentati e la compensazione per l'anemia è estremamente efficiente.

Certe varianti strutturali dell'emoglobina, come la drepanocitica, hanno affinità per l'ossigeno relativamente bassa rispetto all'Hb A, per cui nei pazienti affetti c'è un discreto compenso per l'anemia.

#### 60.4.2 Classificazione delle anemie

Una classificazione su base fisiopatologica delle anemie è la seguente:

- a) Anemie dovute a difetti di maturazione degli eritrociti.
  1. Anemie da carenza di ferro.
  2. Anemie megaloblastiche.
  3. Anemie sideroblastiche.
- b) Anemie da disordini genetici della maturazione degli eritrociti.
  1. Talassemie.
  2. Anemia sideroblastica congenita.
  3. Anemia diseritropoietica congenita.
- c) Anemie dovute a difetti della proliferazione dei precursori degli eritrociti.
  1. Anemie aplastiche.
- d) Anemie emolitiche.

#### 60.4.3 Anemie dovute a difetti della maturazione degli eritrociti

##### ■ Anemie ferroprive o siderogeniche. Eziopatogenesi

Il deficit di ferro è la causa più frequente di anemia e trova motivazioni differenti nei diversi stadi dello sviluppo.

**Periodo neonatale** (anemie ipocromiche ferroprive del lattante). L'eziologia è da ricercarsi in:

- a) difetto di apporto in seguito a regime latteo prolungato, frequente nei Paesi in via di sviluppo o nelle fasce sociali povere;
- b) nascita prima del termine: nei prematuri la riserva di ferro è più bassa a causa del minor peso. I prematuri nel primo anno di vita hanno bisogno di circa 240 mg di ferro nella dieta contro i 160 mg necessari per un bambino nato a termine;
- c) emorragie neonatali con riduzione delle riserve marziali;
- d) carenze di ferro della madre.

**Prima adolescenza.** L'anemia siderogenica, in questo periodo della vita, è di solito la conseguenza di una maggior richiesta di ferro in coincidenza con l'aumentata velocità di crescita corporea.

**Adulto.** Le cause, nell'adulto, possono essere:

- a) Eccesso di perdita, per lo più dovuta a sanguinamento cronico (90% dei casi). Tale sanguinamento non influenza molto la massa sanguigna, ma induce molto rapidamente un deficit di ferro; ciò si comprende se si ricorda che 10 ml di sangue contengono 5 mg di ferro, cioè più di quanto sia l'assorbimento quotidiano normale. D'altra parte la consistenza della riserva di ferro spiega perché l'anemia compaia solamente dopo parecchi mesi di sanguinamento. Il punto di partenza di queste piccole emorragie è per lo più digestivo (ernie iatali, varici esofagee, ulcera peptica, neoplasie dello stomaco o del grosso intestino, emorroidi) o genitale. Nei Paesi del terzo mondo la causa principale è da ricercarsi nei parassiti del tratto gastrointestinale. Durante il periodo fertile della vita, si stima che in circa il 40% delle donne si stabilisca un bilancio negativo di ferro e che nell'80% di esse si instauri anemia ferropriva. Le gravidanze aumentano il rischio della carenza ed il regime alimentare della donna limita le possibilità di compenso, tenendo presente il fatto che la quantità totale di ferro assorbito dipende dal contenuto di metallo nel bolo alimentare. Si comprende perciò come nella donna emorragie croniche, anche di entità minore che nell'uomo, possano determinare carenze marziali gravi. È il caso di menorragie, spesso misconosciute, che raddoppiano o triplicano il volume fisiologico delle mestruazioni.

b) Carenze di apporto. Sono molto più rare, dovute in genere a difetti di assorbimento per lesioni digestive o per gravi sindromi di malassorbimento; i pazienti che hanno subito un intervento di resezione gastrica possono andare incontro a deficit marziale dato che l'acido cloridrico dello stomaco gioca un importante ruolo nell'assorbimento del metallo (vedi Cap. 50).

Essendo il ferro un costituente importante dell'eme, tutte le carenze del metallo bloccano l'eritropoiesi. In un primo tempo il ferro è rimosso dalle riserve. Quando queste si esauriscono, si determina una riduzione del tasso di ferro sierico ed un aumento della transferrina plasmatica. A questo punto non vi è ancora, di regola, la comparsa di anemia, per cui la morfologia degli eritrociti ed i vari indici ematici possono ancora essere relativamente normali. L'anemia, inizialmente, può essere normocromica, ma, una volta che si instaura un deficit severo del ferro, viene interessata l'eritropoiesi: la concentrazione di emoglobina negli eritroblasti aumenta troppo lentamente, l'anemia diventa ipocromica e compare la microcitosi. Essa è, in questa fase, arigenativa (difetto della sintesi di emoglobina e della produzione dei globuli rossi da parte del midollo). Queste modificazioni si riflettono sugli indici eritrocitari con diminuzione dell'MCHC e dell'MCV. Uno striscio di sangue periferico evidenzierà l'ipocromia, la microcitosi, l'anisopoichilocitosi in grado variabile. Infine, se la carenza di ferro diventa grave, c'è, in aggiunta all'anemia, un danno epiteliale, presumibilmente causato da deplezione degli enzimi che contengono ferro nei tessuti.

Accanto ai bassi livelli di ferro ed all'aumento della capacità totale a legare il metallo nel siero (transferrina), si ha assenza di sideroblasti e di riserve marziali nel midollo osseo ed una riduzione dei livelli di ferritina plasmatica. Inoltre la protoporfirina 9, che non può trasformarsi in eme, si accumula negli eritroblasti.

### ■ Anemia nelle infiammazioni croniche

Definita dagli anglosassoni *Anemia from Chronic Disease (ACD)*, questa forma di anemia, generalmente normocitica e normocromica e solo talora microcitica, si manifesta soprattutto negli anziani, affetti da infezioni batteriche persistenti, da disordini immunitari (soprattutto collagenopatie), da fenomeni necrotici conseguenti ad ustioni o ad eventi politraumatizzanti, da neoplasie, da epatopatia alcolica. La sua definizione enfatizza il movente eziologico, ma la patogenesi è dovuta al fatto che gli agenti eziologici suddetti (e qualche altro qui non menzionato) comportano un persistente rilascio di citochine proinfiammatorie, in particolare IL-1, IL-2, IL-6, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , da popolazioni di linfociti e di macrofagi, che si ritiene agiscano provocando:

- a) Ridotto rilascio di ferro dalle cellule in cui è depositato e suo ridotto assorbimento intestinale, causato dall'eccessivo rilascio di epcidina dagli epatociti, sottoposti alla stimolazione citochinica. Si ricorda (vedi par. 60 3.1.3) che l'epcidina modula il funzionamento della ferroportina, riducendo il rilascio del ferro dagli epatociti, dai macrofagi e dagli enterociti duodenali.
- b) Aumento dell'emocateresi per stimolazione del sistema reticoloendoteliale.
- c) Danno citochinico diretto delle cellule midollari.

È stato anche dimostrato un ridotto apporto di EPO ai precursori eritroidi.

Il diretto rapporto cause → effetto patologico è dimostrato dalla scomparsa dell'anemia quando con la terapia si ottiene la guarigione o la remissione della malattia che ne ha provocato la comparsa.

### ■ Anemie megaloblastiche

Sono di solito causate da deficit di vitamina B12 o di acido folico. Questa carenza determina un difetto primitivo nel metabolismo del DNA e quindi nella proliferazione e nella maturazione cellulare. L'effetto più evidente coinvolge i tessuti in attiva proliferazione: midollo osseo, epiteli e gonadi. Il principale effetto sul sistema emopoietico è la produzione di eritrociti di forma anomala (*eritropoiesi megaloblastica*) che porta ad un tipo di anemia in cui i globuli rossi sono più grandi (macroцитi). L'alterazione del metabolismo del DNA si riflette anche nella maturazione dei globuli bianchi e delle piastrine.

La fisiopatologia dell'eritropoiesi megaloblastica non è ancora del tutto compresa. C'è un difetto nella maturazione dei globuli rossi che si riflette nella presenza, nel midollo osseo, di precursori eritrocitari molto più primitivi del normale. I precursori nucleati evidenziano un arresto della maturazione nucleare, che si rivela dalla cromatina finemente distribuita. Nonostante il difetto nella sintesi degli acidi nucleici, la sintesi proteica può avvenire normalmente e l'emoglobina è presente in questi grossi ed immaturi eritroblasti con apparente asincronia tra la maturazione nucleare e quella citoplasmatica. Tutti gli eritrociti in via di sviluppo sono più grossi del normale e quelli maturi emergono come macroцитi dalla forma tipicamente ovale.

**Fisiopatologia.** L'anemia megaloblastica è l'esempio meglio studiato di *eritropoiesi inefficace*. L'anemia produce una straordinaria spinta eritropoietica attraverso l'eritropoietina. C'è una marcata ipertrofia del midollo osseo che si espande, in forma funzionale, alle diafisi delle ossa lunghe. Il midollo è ipertrofico ed il paziente è anemico. Studi eritrocinetici indicano che, benché vi sia anche una certa emolisi periferica, presumibilmente dovuta alla forma ed alle dimensioni

anomale delle emazie, la causa maggiore dell'anemia è la maturazione anormale e la distruzione intramidollare dei precursori eritrocitari. L'eritropoiesi totale del midollo è aumentata fino a tre volte la norma, ma l'effettiva produzione di eritrociti è inferiore. Poiché i globuli rossi che passano nel sangue periferico non sopravvivono a lungo, si instaura il quadro di un'anemia severa. Con appropriato trattamento con acido folico o vitamina B12 c'è un rapido ritorno all'eritropoiesi normoblastica. Se il midollo osseo è esaminato anche solo 24-48 h dopo l'inizio del trattamento, già possono notarsi i primi segni della normalizzazione. Dopo 3-5 giorni il numero dei reticolociti nel sangue periferico comincia ad aumentare e raggiunge un picco a 7-10 giorni. La guarigione si ha nello spazio di tre mesi. Il quadro descritto qui vale sia per la carenza di acido folico che di vitamina B12. Vediamo ora separatamente i quadri eziopatogenetici dei due deficit.

**Deficit di vitamina B12.** Come tutte le carenze vitaminiche, il deficit della B12 (che causa il quadro clinico di anemia megaloblastica noto come anemia perniciososa) può essere dovuto a ridotto apporto dietetico, ridotto assorbimento o ridotta utilizzazione.

**a) Ridotto apporto dietetico.**

È raro, eccetto che in popolazioni che, per problemi religiosi o per altre ragioni aderiscono ad una rigorosa dieta vegetariana.

**b) Ridotto assorbimento.**

**1.** La causa più comune di anemia perniciososa è la mancanza di fattore intrinseco. Essa può essere (raramente) congenita, e si comporta come un carattere autosomico recessivo o, più spesso, acquisita in seguito a gastrectomie che interessano gran parte dell'area gastrica, che produce il fattore intrinseco.

La causa più comune dell'anemia perniciososa è l'atrofia della mucosa gastrica che determina un deficit di fattore intrinseco. Essa fu per la prima volta descritta al Guy's Hospital di Londra da Thomas Addison ed è perciò anche nota come *anemia pernicioso addisoniana*. L'eziologia dell'atrofia gastrica non è chiara. Sono probabilmente coinvolti fattori genetici ed autoimmunitari. I fattori genetici possono evincersi dall'alta incidenza della malattia in certe popolazioni (Scandinavi) e nell'associazione con il gruppo sanguigno A. Inoltre l'incidenza è più frequente tra i familiari di persone ammalate. La gastrite dell'anemia pernicioso è caratterizzata da un'infiltrazione linfocitaria nella mucosa atrofica con assenza di produzione di acido cloridrico e pepsina anche dopo stimolazione con istamina o con prostaglandine. I livelli di gastrina serica sono aumentati. La patogenesi autoimmunitaria

è indicata dalla presenza di autoanticorpi contro componenti citoplasmatici delle cellule parietali nel 90% dei pazienti. Spesso sono presenti anche autoanticorpi contro le cellule tiroidee. Inoltre il 57% dei pazienti con anemia pernicioso ha anticorpi policlonali del tipo IgG e IgA anti fattore intrinseco nel siero, nella saliva e nel succo gastrico. Questi reagiscono con due differenti siti sulla molecola del fattore intrinseco: alcuni prevengono il legame della vitamina, altri impediscono l'assorbimento a livello dell'ileo. In conclusione, sembra che individui con predisposizione genetica per l'anemia pernicioso possano sviluppare un danno autoimmune alla mucosa gastrica e produrre anticorpi verso il fattore intrinseco.

**2.** Malattie dell'ileo. La vitamina B12 è assorbita in gran parte in questo tratto intestinale, per cui la sua patologia si accompagna spesso a deficit di assorbimento della vitamina (restrizioni chirurgiche dell'ileo; ileiti; malattia di Crohn; sprue tropicale; lesioni anatomiche, quali ad esempio i diverticoli, che causano una stasi del contenuto intestinale con proliferazione di batteri che possono consumare la vitamina B12; infestazioni da *Diphyllobothrium latum*).

C'è una rara malattia dell'ileo terminale che causa anemia megaloblastica nell'infanzia; essa è associata a proteinuria ed è nota con l'eponimo di sindrome di Imerslund o sindrome da malassorbimento selettivo di vitamina B12.

**c) Ridotta utilizzazione.**

**d) Deficit congenito di transcobalamina.**

Nell'anemia pernicioso vi è una specifica sindrome neurologica dovuta ad un processo degenerativo del midollo spinale caratterizzato da lesioni degenerative delle colonne laterali e dorsali. Le prime modificazioni sono caratterizzate da rigonfiamento delle singole fibre nervose mieliniche; queste lesioni convergono in larghi foci che coinvolgono molti sistemi di fibre. Nella sostanza bianca del cervello c'è degenerazione a chiazze. Questo causa una notevole varietà di quadri clinici, inclusi manifestazioni cerebrali (pazzia megaloblastica), alterazioni del gusto e dell'olfatto, difetti della vista con scotoma centrale ed atrofia del nervo ottico, atassia, dovuta a ridotta funzione delle colonne dorsali, neuropatia periferica e, in qualche caso, paraplegia spastica o tetraplegia quando sono coinvolte le colonne laterali.

In aggiunta ai sintomi dell'anemia e dei danni neurologici, i pazienti con anemia pernicioso hanno un colorito giallo limone dovuto al leggero aumento di bilirubina non coniugata e circa un terzo di essi hanno una splenomegalia.

e) *Deficit di folati.*

Le cause del deficit di folati possono così schematizzarsi:

1. Ridotto apporto: è causato da una dieta povera in frutta o verdura.
2. Ridotto assorbimento: malattie che coinvolgono il digiuno (morbo celiaco, malassorbimento, sprue tropicale).
3. Aumentato fabbisogno: in gravidanza, in pazienti con aumentata attività midollare secondaria ad anemie emolitiche croniche o a disordini mieloproliferativi.
4. Iatrogena: alcuni farmaci interagiscono con il metabolismo dei folati, soprattutto il metotrexate e gli antifolati. Alcuni anticonvulsivanti possono produrre deficit di folati, probabilmente alterandone l'assorbimento intestinale.

Il deficit di folati produce un'anemia macrocitica con emopoiesi megaloblastica identica a quella che si ha con la carenza di vitamina B12. Gli effetti sulla mucosa gastrointestinale e sulla pelle sono identici nei due deficit, ma la carenza di folati di rado produce sintomi neurologici.

### ■ Anemie sideroblastiche

Le anemie sideroblastiche, che sotto l'aspetto eziologico possono essere ereditarie o acquisite, sono caratterizzate da alterazioni nella sintesi dell'eme, che comportano una riduzione nella formazione dell'emoglobina. Mentre nel sangue periferico si evidenzia un'anemia microcitica ipocromica, all'esame del midollo osseo, gli eritroblasti risultano infarciti da depositi di ferro sia nel contesto dei mitocondri che sotto forma di granuli perinucleari. Si tratta dei cosiddetti *sideroblasti ad anello*, la cui presenza è patognomonica per la diagnosi, quando essi costituiscono più del 15% di tutti gli eritroblasti, nei quali il ferro può essere anche presente sotto forma di pochissimi granuli citoplasmatici.

L'alterata sintesi dell'eme comporta la presenza di una eritropoiesi inefficace: nel midollo, difatti, l'iperplasia dei precursori della serie eritroide si associa ad un'accentuata mortalità degli eritroblasti nel corso del loro processo maturativo e ad una ridotta produzione di reticolociti.

Nelle forme ereditarie la mutazione più frequente è a carico di un gene, mappato nel cromosoma X, che codifica per la  $\delta$ -aminolevulinico sintasi (ALA-S2), un enzima coinvolto nelle tappe iniziali della sintesi dell'eme per cui la sua deficienza appare strettamente correlabile alla alterata sintesi dell'eme ed alla conseguente ridotta formazione di emoglobina, nonché all'infarcimento di ferro, che oltre agli eritroblasti, può riscontrarsi anche nei macrofagi midollari.

Un'altra forma di anemia sideroblastica associata

ad atassia è dovuta a mutazioni del gene che codifica per una proteina ABCB7 (ATP Binding Cassette), anch'essa coinvolta nella sintesi dell'anello protoporfirico e localizzata sulla membrana mitocondriale dove funziona da *carrier* per molte proteine.

Altre mutazioni a incidenza più bassa riguardano il gene SLC25A38, che codifica per l'omologa proteina, funzionante anch'essa da *carrier* mitocondriale ed implicata anch'essa nella sintesi dell'eme.

Le forme acquisite, oltre che idiopatiche, possono essere iatrogene (uso prolungato di cloramfenicolo o di isoniazide o di penicillamina) o risultare secondarie ad intossicazioni da piombo o da zinco, ovvero ad abuso di alcool. Accanto a queste forme, suscettibili di miglioramento ed anche di guarigione con la sospensione della terapia o dell'esposizione al tossico (ad es. cloramfenicolo, isoniazide), che le ha prodotte, se ne riscontrano alcune irreversibili, caratterizzate dalla presenza nel sangue di due popolazioni eritrocitarie, una normocromica ed una ipocromica. Si ritiene che queste ultime forme siano la conseguenza di mutazioni somatiche che causano un difetto della sintesi dell'eme simile a quello che si verifica nelle forme ereditarie.

## 60.4.4 Disordini genetici della maturazione degli eritrociti

### ■ Talassemie

Furono descritte per la prima volta da Thomas Coley nel 1925. Possono definirsi come un gruppo di alterazioni genetiche della sintesi dell'emoglobina in cui c'è una mancata o ridotta produzione di una o più catene globiniche dell'emoglobina. Secondo il tipo di catena affetta, si possono distinguere in  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta\beta$ ,  $\gamma\delta\beta$ , e  $\delta$  talassemie. Le più comuni sono le forme  $\alpha$  e  $\beta$ . Queste a loro volta possono essere suddivise in  $\alpha^0$  e  $\beta^0$  se le catene  $\alpha$  e  $\beta$  non sono prodotte, e  $\alpha^+$  e  $\beta^+$  se c'è una certa sintesi di  $\alpha$  o  $\beta$ , ma a velocità ridotta. Uno schema generale della patogenesi delle  $\alpha$  e  $\beta$  talassemie è mostrato nella figura 60.28. Le  $\beta$  talassemie influenzano solo la formazione dell'emoglobina dell'adulto. La sintesi di Hb F è normale e perciò la malattia si manifesterà solo dopo la nascita. L'eccesso di catene  $\alpha$  non è in grado di formare tetrameri e precipita nei precursori eritrocitari. D'altra parte, nell' $\alpha$ -talassemia è alterata sia la sintesi di emoglobina fetale che quella di emoglobina adulta. L'eccesso di catene non- $\alpha$  porta alla formazione di tetrameri di Hb anomali: nella vita fetale si formerà l'Hb Bart ( $\gamma_4$ ), nella vita adulta l'Hb H ( $\beta_4$ ).

**Genetica molecolare.** Il preciso difetto genetico che causa alcune forme di talassemia è ora ben conosciuto. Questo, in alcuni casi, è stato reso possibile semplicemente con la mappatura con enzimi di restrizione dei geni della globina. Nel caso in cui la lesione molecola-

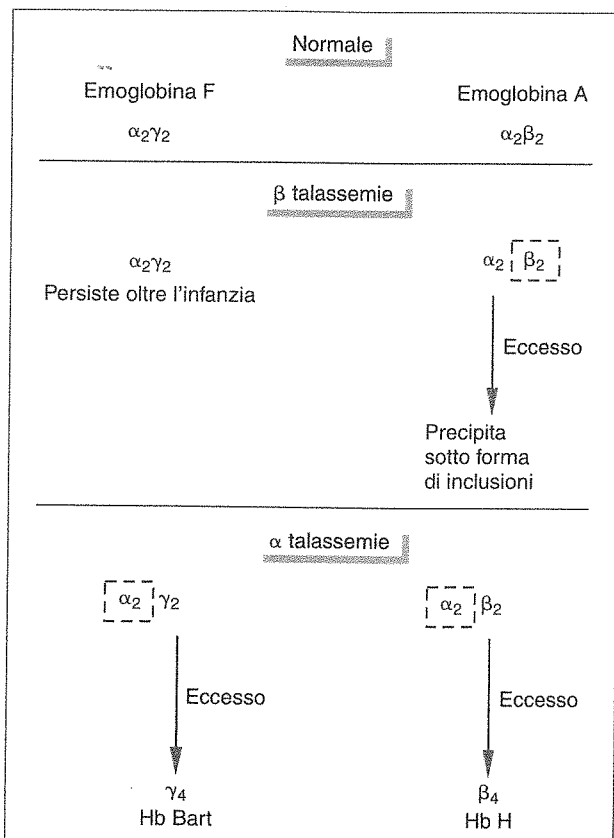


FIG. 60.28 Schema dei meccanismi patogenetici delle talassemie.

re è più piccola e non è associata con un riarrangiamento o una delezione di un gene, è stato necessario clonare i geni appropriati in batteriofagi e sequenziarli. Da questi sofisticati studi è emerso un quadro di notevole diversità molecolare. La  $\beta$ -talassemia può sottintendere ben 30 diverse mutazioni; parecchie forme sono la conseguenza o dell'inserzione o della perdita di uno o più nucleotidi con uno spostamento (*frameshift*) nella lettura del codice genetico. Con la perdita, infatti, o con l'inserzione di una, due o quattro basi la lettura della sequenza è completamente alterata. Lo RNA messaggero trascritto da geni così alterati può essere tradotto normalmente solo fino al punto del *frameshift*, oltre il quale la sequenza cambia completamente o la traduzione si arresta. Nell'uno e nell'altro caso non è possibile la sintesi di una catena di globina funzionante. Altre forme di  $\beta$ -talassemia sono causate da mutazioni nonsense con prematuro arresto della sintesi della catena. In questo caso il cambio di una singola base produce un nuovo codone di terminazione o arresto; quando il messaggio è tradotto, invece dell'inserimento di un nuovo aminoacido si ha il prematuro arresto della catena e si produce una catena globinica non funzionante.

Un altro gruppo di  $\beta$ -talassemie è la conseguenza di mutazioni di singole basi che interferiscono con il *processing* dei precursori di RNA messaggero. Queste mu-

tazioni possono avvenire alle giunzioni esone-introne con interferenza nella normale riunione (*splicing*) degli esoni dopo scissione degli introni. Esse impediscono la produzione di RNA messaggero per cui sono associate al tipo di talassemia  $\beta^o$ . Si possono avere delle mutazioni che producono dei nuovi siti di *splicing*, che causano un'incorporazione di una parte dell'introne nell'esone per cui l'RNA messaggero non può essere usato per una normale sintesi di catene  $\beta$ . In questo caso, i siti di *splicing* normali non sono affetti e qualche volta accanto ad RNA messaggero non funzionante, si può avere anche sintesi di RNA normale e quindi il fenotipo della talassemia  $\beta^+$ .

Un altro gruppo di  $\beta$ -talassemie è la conseguenza di mutazioni di una singola base nelle regioni regolatrici situate "upstream" rispetto alla posizione 5 terminale del gene della catena  $\beta$  con interferenza nella trascrizione dell'RNA messaggero della stessa. Infine, una forma di talassemia  $\beta^o$  è il risultato della delezione di 600 basi che coinvolgono la porzione 3 terminale del gene.

La patologia molecolare delle forme di  $\alpha$ -talassemie è differente. Come si è detto in un precedente paragrafo, vi sono due copie di geni per le catene  $\alpha$  per genoma aploide e, quindi, quattro copie per genoma diploide. La forma di  $\alpha$ -talassemia comune è il risultato di una serie di delezioni geniche che coinvolgono uno o ambedue i geni. Le talassemie  $\alpha^+$  sono causate dalla perdita di un solo gene  $\alpha$ , mentre l'altro è funzionante. Le talassemie  $\alpha^o$  sono invece causate da delezioni di differente lunghezza che coinvolgono ambedue i geni  $\alpha$  per cui lasciano sul cromosoma 16 solo il gene  $\delta$  della globina embrionale.

Alcune forme di  $\alpha$ -talassemia non sono dovute a delezione. La forma più comune è una mutazione nel codone di terminazione che si verifica nel 5% delle popolazioni del Sud Est asiatico (*emoglobina Constant Spring*). Si ha la mutazione di una singola base del codone di terminazione UAA in CAA. CAA codifica per la glutammina ed il successivo codone di terminazione si trova dopo altri 90 nucleotidi. L'RNA messaggero copia questi altri trenta codoni e viene regolarmente tradotto a livello citoplasmatico. Ne risulta una catena  $\alpha$  con 31 aminoacidi in più all'estremo C-terminale (la glutammina + 30 aminoacidi codificati dai successivi 90 nucleotidi). Per qualche ragione questo pezzo extra rende instabile l'RNA messaggero, per cui la sintesi di catene  $\alpha$  è lenta e l'anemia si traduce fenotipicamente in una talassemia  $\alpha^+$ .

Anche le talassemie  $\delta\beta$  sono molto eterogenee a livello molecolare. In alcuni casi si tratta di una lunga delezione che rimuove i geni della globina  $\delta$  e della globina  $\beta$  (talassemia  $\Psi^o$ ). Un'altra forma è dovuta alla produzione di emoglobina in cui le catene  $\alpha$  sono combinate con catene non- $\alpha$  formate da una porzione della catena  $\delta$  e da una della catena  $\beta$ . Questo è dovuto ad una fusione



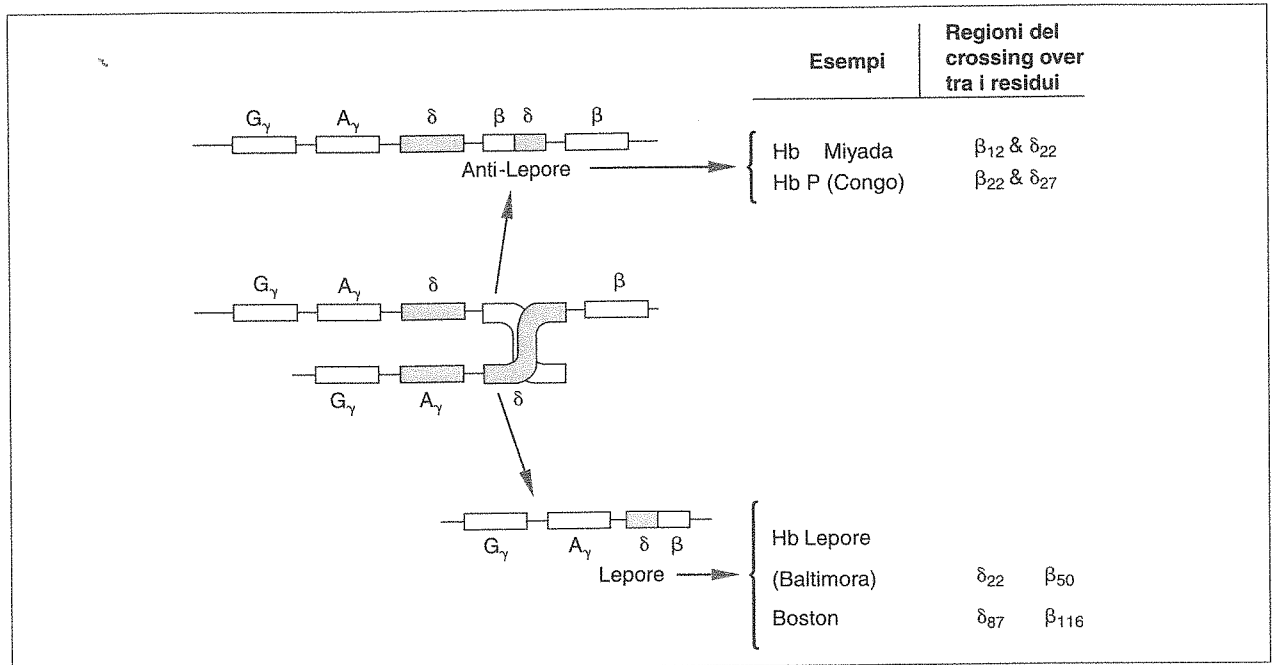


FIG. 60.29 Crossing-over ineguale nelle regioni del genoma che contengono i geni strutturali dell'emoglobina e formazione delle emoglobine Lepore ed anti-Lepore. Gli esempi dati mostrano le localizzazioni delle regioni di crossing over tra i residui di aminoacidi.

dei geni  $\delta$  e  $\beta$  come conseguenza di un crossing over ineguale. L'emoglobina che ne risulta è chiamata emoglobina Lepore dal cognome del primo paziente in cui fu scoperta e ve ne sono diverse varianti in base al punto in cui avviene il crossing over ineguale (Fig. 60.29).

**Talassemie  $\beta$ .** Allo stato omozigote, tutte le forme di  $\beta$ -talassemia si accompagnano ad anemia grave fin dal terzo mese di vita. Se i pazienti sono mantenuti in vita con continue trasfusioni, la morte subentra verso la 2<sup>a</sup>/3<sup>a</sup> decade di vita, dovuta principalmente all'accumulo di ferro con le sue complicanze: diabete, insufficienza epatica, alterazioni ghiandolari (paratiroidei e surreni), danni cardiaci. Il quadro ematico periferico mostra un'anemia ipocromica con aniso-poichilocitosi e molti globuli rossi nucleati. Il midollo osseo mostra i segni di una marcantissima ipertrofia con massa dell'eritrono fino a 40 volte quella normale. Perifericamente vi sono elevati livelli di HbF e nella  $\beta^0$ -talassemia l'emoglobina è tutta di tipo fetale, con piccole quantità di Hb A<sub>2</sub>. Gli eterozigoti sono, solitamente, solo moderatamente anemici, con quadro periferico di ipocromia e microcitosi con bassi valori di MCH e MCV. Vi è un modesto aumento della concentrazione di HbF mentre HbA<sub>2</sub> è notevolmente più elevata.

La lesione principale nel  $\beta$ -talassemico è la difettosa sintesi di catene  $\beta$  con eccessiva produzione di catene  $\alpha$  (Fig. 60.30). Queste sono instabili e precipitano nei precursori degli eritrociti formando grosse inclusioni raggiate, rendendo le cellule più rigide ed interferendo con la divisione cellulare. Le cellule che raggiun-  
gono

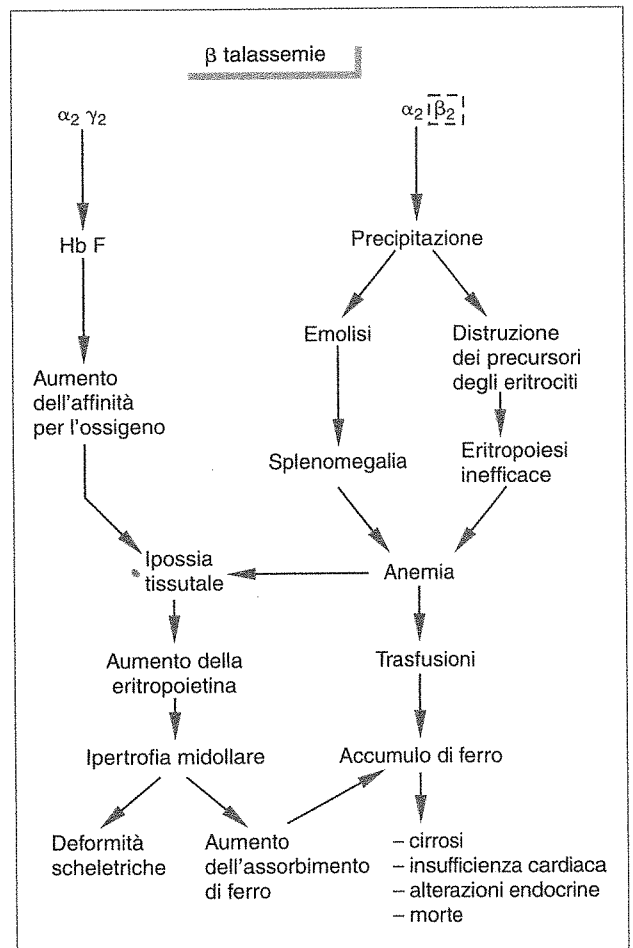


FIG. 60.30 Fisiopatologia delle  $\beta$ -talassemie.

no il sangue periferico sono distrutte prematuramente nella milza (di qui l'indicazione terapeutica alla splenectomia). Alcuni precursori eritrocitari conservano la capacità di sintetizzare catene fetali con produzione di HbF. Questo avviene solo in un numero limitato di precursori, che sopravvivono più a lungo poiché la formazione di emoglobina fetale sottrae parte delle catene  $\alpha$  alla precipitazione. Tuttavia la HbF ha un'affinità per l'ossigeno più alta di HbA e questo, insieme alla grave anemia, produce ipossia tissutale ed aumento di produzione dell'eritropoietina, conseguente ipertrofia midollare, con diffusione del midollo funzionante nella diafisi delle ossa lunghe, nella diploe del cranio e nei siti extramidollari (milza e fegato). Nonostante questa espansione, la maggior parte dell'eritropoiesi è inefficace e quindi di nessuna utilità pratica. Questi pazienti necessitano di trasfusioni regolari; ogni unità di sangue contiene 200 mg di ferro, per cui entro la seconda decade di vita essi accumulano 60-80 g del metallo a cui si aggiunge l'aumento dell'assorbimento causato dall'iperplasia midollare. Il ferro si deposita soprattutto nel sistema endocrino, fegato e miocardio, con fibrosi di questi organi. Inoltre, accumulandosi nei lisosomi, determina la loro rottura, con fuoriuscita degli enzimi idrolitici e danno tissutale.

**Talassemie  $\alpha$ .** Sebbene eterogenee a livello molecolare, vi sono due principali forme della malattia:  $\alpha^0$  e  $\alpha^+$ -talassemia. Lo stato omozigote per la  $\alpha^0$ -talassemia, in cui non sono sintetizzate catene  $\alpha$ , è alla base della sindrome idropica di Bart. Lo stato eterozigote derivante da un incrocio di un tratto genetico  $\alpha^0$  con un tratto  $\alpha^+$  determina la malattia dell'emoglobina H (Fig. 60.31). Anche l'eterozigote che deriva da un eterozigote per  $\alpha^0$  e da un eterozigote per l'emoglobina Constant Spring causa una forma di malattia dell'emoglobina H. La sindrome dell'emoglobina di Bart è una causa molto comune di aborto in tutto il Sud Est asiatico. I bambini colpiti non producono catene  $\alpha$  per cui la loro emoglobina è principalmente di tipo Bart ( $\gamma_4$ ) con piccole quantità di emoglobine H ( $\beta_4$ ). Poiché il trasporto dell'ossigeno dipende da una normale interazione eme-eme, che a sua volta richiede interazione tra catene  $\alpha$  e non- $\alpha$ , queste emoglobine sono funzionalmente inutili: hanno proprietà analoghe a quelle della mioglobina, vale a dire non cedono l'ossigeno a tensioni fisiologiche con grave stato di ipossia dei tessuti. La conseguenza è l'aborto o la morte dopo poche ore di vita. Il quadro ematico periferico è caratterizzato da un'anemia grave con il tipico quadro talassemico descritto prima e molti normoblasti. Il midollo presenta il tipico quadro dell'iperplasia eritroide. L'anemia deriva dal fatto che l'emoglobina Bart è relativamente instabile con conseguente marcata componente emolitica.

La malattia da emoglobina H è caratterizzata da un grado variabile di anemia ipocromica e splenomegalia.

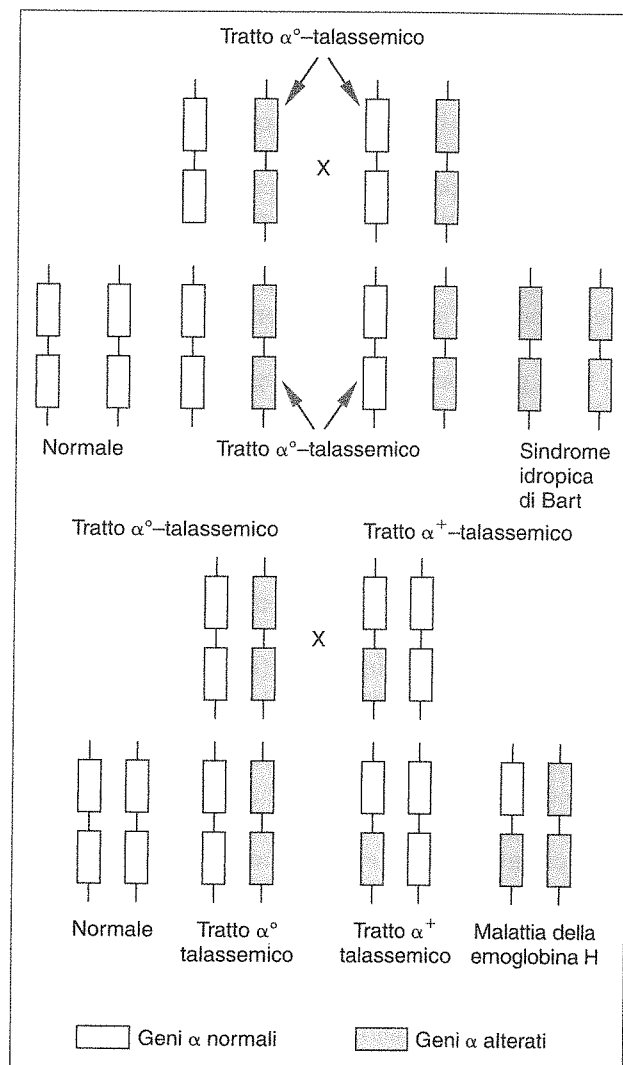


Fig. 60.31 Genetica delle  $\alpha$ -talassemie.

Ci sono anche aniso e poichilocitosi. La fisiopatologia è ben compresa. L'eritropoiesi è meno inefficace che nella  $\beta$ -talassemia poiché l'eccesso di catena  $\beta$  forma tetrameri solubili ( $\beta_4$ ). Comunque, essi sono relativamente instabili e formano delle inclusioni con l'invecchiamento eritrocitario con conseguente prematura eliminazione da parte della milza e degli organi del sistema reticoloendoteliale e quindi, in ultima analisi, anemia emolitica. L'emoglobina H si accompagna a spiccato aumento dell'assorbimento di ferro, ma non ad accumulo del metallo. I pazienti non necessitano di trasfusioni. Inoltre, dato che il legame all'aptoglobina avviene attraverso le catene  $\alpha$ , la loro mancanza nella Hb H evita questo legame con conseguente aumento della loro escrezione urinaria. La perdita di ferro che ne deriva compensa per il suo aumentato assorbimento.

Gli eterozigoti  $\beta^0$  e  $\alpha^+$  talassemici presentano un'anemia modesta con scarse alterazioni eritrocitarie e dell'emoglobinnizzazione. Alla nascita è presente un'aumentata concentrazione di Hb Bart.

**Talassemie  $\delta\beta$ .** Sono forme meno gravi delle precedenti caratterizzate dalla mancata produzione di catene  $\beta$  e  $\delta$ . Allo stato omozigote vi è un'anemia moderata con splenomegalia e l'emoglobina è completamente di tipo F. Quando i geni  $\beta$  e  $\delta$  sono completamente deleti, la sintesi di  $\gamma$  compensa più efficacemente la mancanza di catene  $\beta$  di quanto non avvenga nelle talassemie  $\beta$ . Le forme con l'emoglobina Lepore sono più severe e, quando omozigote, si avvicinano alle  $\beta$ -talassemie. Per qualche ragione non nota, la produzione di catene  $\gamma$  è meno efficiente quando c'è una fusione genetica  $\delta\beta$  che quando i due geni sono deleti. L'emoglobina Lepore, come si è detto, è una forma anomala di Hb, prodotta da un'ineguale *crossing over* dei geni  $\beta$  e  $\delta$ . In tale condizione manca la produzione di catene  $\beta$  e  $\delta$  libere e si ha la sintesi, sia pure insufficiente, di una catena polipeptidica costituita da catena  $\delta$  nella porzione aminotermine e da catena  $\beta$  nella porzione carbossiterminale.

C'è un gruppo di condizioni morbose correlate alla talassemia  $\delta\beta$  che sono dovute al permanere per cause ereditarie di emoglobina fetale (*Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin*: HPFH). Pur non avendo una grande rilevanza clinica, esse forniscono un importante modello per studiare la regolazione genetica del controllo dell'emoglobina fetale ed adulta durante lo sviluppo. Sono caratterizzate da difettosa o assente sintesi di catene globiniche  $\delta$  e  $\beta$ , ma questo è quasi completamente compensato dalla produzione di catene  $\gamma$ .

**Altre forme minori di talassemia.** Vi sono alcune forme di talassemia  $\beta$  di severità intermedia tra gli stati omozigoti ed eterozigoti. Almeno in alcuni di questi casi, sembra che i pazienti siano omozigoti per la  $\beta$ -talassemia, ma hanno anche ereditato un gene  $\alpha$ -talassemico. Questo riduce lo squilibrio delle catene globiniche e quindi è causa di una più modesta sintomatologia.

Un altro importante gruppo è quello dovuto all'eredità sia di un gene talassemico che di una variante strutturale dell'emoglobina. La forma più comune è quella che risulta dall'unione di un gene per la  $\beta$ -talassemia con quello per Hb S o C o E. Ne risultano le talassemie Hb S, Hb C e Hb E, comuni in Africa e nel Sud Est asiatico.

#### 60.4.5 Anemie dovute ad alterazioni della proliferazione dei precursori degli eritrociti

A questo gruppo appartengono le anemie ipoplastiche ed aplastiche. Esse si possono classificare nel seguente modo:

- a) Anemie aplastiche o ipoplastiche associate con alterazioni generali del midollo osseo con coinvolgimento della serie bianca e delle piastrine.
  1. Anemia aplastica congenita o anemia di Fanconi.

2. Anemia aplastica acquisita.
  - Primaria o idiopatica.
  - Secondaria a: farmaci; sostanze chimiche; radiazioni ionizzanti; infezioni virali; infiltrazioni metastatiche del midollo.

b) Aplasie o ipoplasie degli eritrociti.

1. Forma congenita o anemia di Diamond-Blackfan.
2. Forme acquisite.
  - Primaria o idiopatica (acuta transitoria o cronica).
  - Secondaria a: tumori timici; infezioni; alterazioni renali; carcinomi; linfomi; deficit di riboflavina.

#### ■ Anemia aplastica

È caratterizzata da una riduzione di tutti gli elementi figurati del sangue per cui è anche definita pancitopenia. Viene distinta in una forma congenita ed in una acquisita. L'anemia aplastica o ipoplastica congenita o anemia di Fanconi è una forma rara ma molto interessante. Sebbene sembri essere dovuta ad un difetto ereditario della proliferazione cellulare, spesso si manifesta solo nell'adolescenza. È caratterizzata da una pancitopenia associata ad anomalie congenite quali un difetto di pigmentazione cutanea, ipoplasia renale, difetti ossei (compresa la mancanza del radio) e microcefalia. L'alterazione di base risiede nei meccanismi di riparazione del DNA come si evince anche dalle ricerche di genetica che hanno identificato la presenza di mutazioni in diversi geni che codificano per enzimi coinvolti nella suddetta riparazione, definiti geni FANC.

L'anemia aplastica acquisita è idiopatica quando non si riesce a risalire alla sua causa. Alcune forme hanno una probabile patogenesi di tipo autoimmunitario. Le forme secondarie riconoscono svariate cause. Possono essere implicati alcuni farmaci di uso comune (antinfiammatori, antitiroidei, antibiotici) o perché vi è ipersensibilità individuale verso di essi, ed allora agiscono anche in piccole dosi, o perché sono somministrati in grosse dosi. Alcuni virus (ad esempio il virus dell'epatite) possono determinare ipoplasia transitoria riducendo il numero delle CFU-E e delle BFU-E. Il nome di VHS (*Virus Hemophagocytic Syndrome*) è stato attribuito ad una condizione patologica in cui c'è un'intensa eritrofagocitosi nel midollo associata a febbre, pancitopenia rapidamente progressiva e ad un grave malessere sistemico. La fisiopatologia di questa sindrome, che può essere associata a svariate infezioni virali differenti, deve ancora essere chiarita.

Le radiazioni ionizzanti, che esercitano il loro effetto soprattutto sui tessuti in attiva proliferazione, possono ad alte dosi produrre estese distruzioni del midollo, a basse dosi causare un'anemia aplastica cronica. Altri importanti fattori di depressione midollare sono il benzene ed i suoi derivati ed alcuni metalli pesanti.

### ■ Anemia di Blackfan-Diamond ed ipoplasie ed aplasie selettive degli eritroblasti (eritroblastopenia)

L'anemia di Blackfan-Diamond è una rara malattia genetica con un'incidenza annuale di 1 caso ogni 100.000-200.000 nascite, che si rende sintomatologicamente manifesta molto precocemente con la comparsa di pallore e dispnea nel neonato, che è spesso anche portatore di malformazioni di vario tipo. Nei casi in cui la malattia si presenta con caratteristiche di familiarità, si è potuto stabilire che la sua trasmissione è di tipo autosomico dominante. Sono stati identificati diversi geni le cui mutazioni si correlano alla comparsa della malattia, tanto che in caso di familiarità si può procedere alla diagnosi prenatale della malattia. Si tratta di geni che codificano tutti per proteine ribosomiali che sono stati definiti con la sigla RP (Ribosomal Proteins) seguita da una lettera maiuscola e da un numero ed anche da un'altra lettera che indica la proteina ribosomiale codificata: RPS19, RPS24, RPS17, RPS14, RPS16, RPS19, RPL35A, RPL5, RPL11. La correlazione gene mutato-anemia malformazione non è stata chiarita, ma è stato notato che le mutazioni a carico dei geni RPS19, RPL5 e RPL11 sono quelle di maggior riscontro.

L'anemia dipende dalla forte riduzione dei precursori midollari eritroidi (eritroblastopenia), causata da apoptosi, per cui all'esame emocromocitometrico non si evidenziano nella maggior parte dei casi alterazioni numeriche a carico degli elementi della serie bianca e delle piastrine. Nei casi gravi la sopravvivenza dei piccoli pazienti è legata alle reiterate trasfusioni, mentre nei casi meno gravi la terapia steroidea dà risultati soddisfacenti, mentre il trapianto allogenico di midollo è consigliabile ai pazienti che non rispondono ai corticosteroidi.

Una eritroblastopenia transitoria può raramente manifestarsi nei pazienti con infezione cronica da parvovirus B19, ed anche nei pazienti neoplastici ed in quelli affetti da gravi patologie autoimmunitarie. Nel siero di alcuni di essi sono stati trovati anticorpi anti EPO ed anticorpi che reagiscono con i precursori midollari eritroidi.

#### 60.4.6 Anemie emolitiche

Quando la vita media degli eritrociti è accorciata, c'è una riduzione della massa degli eritrociti circolanti. Questo causa un'ipossia relativa dei tessuti che determina un'aumentata produzione di eritropoietina.

Si ha stimolazione dell'eritropoiesi e la massa eritrocitaria è riportata a valori normali. Per questo motivo se la vita media degli eritrociti non è troppo accorciata e il midollo osseo è in buone condizioni fisiologiche, non vi sono modificazioni di rilievo a carico degli eritrociti circolanti. In questo caso si parla di stato

emolitico compensato. Comunque, quando la velocità di distruzione dei globuli rossi è otto volte maggiore della norma (cioè la loro sopravvivenza è inferiore a 15 giorni), anche un midollo osseo normale non può compensare e si ha un'anemia emolitica. Se il midollo osseo è in qualche modo alterato, o se c'è un inadeguato apporto di ferro o di altre sostanze richieste per l'emopoiesi, l'anemia può rendersi evidente anche se la vita media eritrocitaria è più lunga di 15 giorni.

### ■ Fisiopatologia dell'emolisi

La distruzione degli eritrociti può verificarsi sia intra- che extravascolarmente o, come succede più comunemente, in ambedue i siti. Il luogo di distruzione dipende dal tipo e dal grado di danno eritrocitario. Per esempio, le cellule danneggiate dal complemento hanno grossi buchi nella membrana e sono distrutte intravascolarmente, mentre quelle ricoperte da IgG sono rimosse dal sistema reticoloendoteliale.

Circa l'80% dell'eme liberato dall'emoglobina è convertito a bilirubina per cui negli stati emolitici vi è un aumento della produzione di bilirubina ed anche di urobilinogeno urinario e fecale. Queste sostanze non danno affidamento per una precisa misura della velocità di emolisi, poiché la bilirubina può anche derivare da eritropoiesi inefficace ed i livelli di urobilinogeno fecale dipendere anche dall'attività dei microrganismi intestinali. Il livello della bilirubina circolante dipende poi sia dalla velocità dell'emolisi che dalla velocità di coniugazione e di escrezione del fegato.

L'emoglobina liberata in circolo si lega alla *aptoglobina*. Le aptoglobine sono un gruppo di  $\alpha$  globuline sintetizzate nel fegato. La migrazione elettroforetica ha evidenziato diverse varietà e la loro struttura è determinata da due sistemi allelici. Si riconoscono tre fenotipi: 1-1, 2-2, 2-1. Esse sono composte di unità simili, ma differiscono rispetto al peso molecolare, alla capacità a legare l'emoglobina ed alla velocità di clearance. Normalmente è presente una quantità di aptoglobina sufficiente a legare da 100 a 140 mg di emoglobina/100 ml di plasma. Il complesso aptoglobina-emoglobina non è escreto dal rene, ma è eliminato dal plasma mediante il sistema reticolo endoteliale ad una velocità di circa 15 mg di Hb/100 ml/h. Per questo motivo l'indice più sensibile di emolisi intravascolare è una riduzione dei livelli serici di aptoglobina. Se viene superata la capacità plasmatica di legare l'emoglobina, questa compare nel plasma in forma libera, dov'è degradata e l'eme, liberato, si lega all'*emopessina*.

L'emopessina è una  $\beta$  glicoproteina costituita da due componenti, I e II: I è un monomero, e II, che all'elettroforesi dà 4 bande, è una forma polimerica. La sua concentrazione normale è approssimativamente di 80 mg/100 ml di plasma. Il complesso eme-emopessina è rimosso dalla circolazione dal fegato. Quando l'emo-

pessina è satura, l'eme può legarsi all'albumina, formando metemalbumina (o metaemoalbumina) e, se l'emolisi è molto grave, il plasma può assumere un colore marrone dovuto alla presenza di questo metabolita. Inoltre, in questo caso, l'emoglobina può comparire nelle urine. L'emoglobina infatti spontaneamente si dissocia negli  $\alpha$  e nei  $\beta$  dimeri con un peso molecolare di 32.000 Da, piccoli abbastanza da permettere la filtrazione a livello glomerulare. Se i livelli di emoglobina plasmatica sono inferiori a 13 mg/ml, l'emoglobina non compare nelle urine poiché è riassorbita nei tubuli prossimali renali. Al di sopra di questi livelli si ha emoglobinuria. Quando l'emoglobina è riassorbita a livello tubulare, è rapidamente degradata e nelle cellule tubulari si forma emosiderina, che compare nelle urine. La presenza di emosiderina in un sedimento urinario è un segno molto importante di emolisi intravascolare cronica.

**Meccanismi compensatori.** L'anemia emolitica si accompagna ad un aumento della produzione di eritropoietina ed alla stimolazione dell'eritropoiesi. Questo porta ad un cambiamento nel rapporto mieloide/eritroide in favore di quest'ultimo. Se la stimolazione continua, il midollo si espande lungo le diafisi delle ossa lunghe. Quindi, se c'è un'emolisi cronica sin dalla prima infanzia, ci può essere espansione del midollo nelle ossa del cranio, vertebre, ossa lunghe, con conseguenti marcate deformità ossee. Un'altra conseguenza della stimolazione eritropoietinica è il minor transito dei precursori degli eritrociti nel midollo con la produzione di grossi macrociti e reticolocitosi di vario grado. L'iperplasia eritroide determina un maggior assorbimento del ferro, e quindi l'emolisi cronica si accompagna a sovraccarico tissutale del metallo.

### ■ Meccanismi della prematura distruzione degli eritrociti

La prematura distruzione degli eritrociti si può avere per le seguenti ragioni:

- a) Anomalie della membrana degli eritrociti. Se un globulo rosso deve sopravvivere nella circolazione, è necessario che sia in grado di conservare la sua forma e la permeabilità, e che possa sottostare a deformazioni plastiche quando attraversa il microcircolo. La plasticità della cellula deriva soprattutto dal rapporto superficie-volume che, a sua volta, dipende dall'integrità della sua membrana. La normale funzione della membrana si basa sulla produzione di energia per il trasporto attivo di sodio e di potassio e per il mantenimento dei gruppi -SH proteici in uno stato ridotto. Essa è in funzione, poi, dell'esistenza di un sistema per il rinnovamento dei lipidi di membrana, necessario per conservare una normale composizione lipidica. Anomalie di ognuna di queste funzioni tendono a determinare una

modificazione di forma del globulo rosso, che diventa sferico, con riduzione del rapporto superficie/volume e, quindi, della sua deformabilità. La risultante perdita di plasticità porta al selettivo sequestro delle cellule affette nella milza e in altre parti del sistema reticolo endoteliale. Questo processo si ha ogni qualvolta la membrana sia strutturalmente anomala e ci sia un aumentato flusso di sodio. Per questo motivo esso si può osservare nella sferocitosi ereditaria, in situazioni in cui c'è una ridotta quantità di energia prodotta nella cellula a causa di deficit genetici dei suoi enzimi glicolitici, in altre forme di deficit enzimatici che rendono la cellula sensibile a stress ossidativi o causano ossidazioni dei gruppi sulfidrilici delle membrane, e nei disordini associati con anomalie del metabolismo lipidico. Il danno alla membrana può anche essere il risultato dell'interazione di anticorpi o dell'attivazione del complemento sulla superficie della cellula, di traumi, di sostanze chimiche, di batteri, di parassiti, di alterazioni strutturali dei componenti proteici della membrana.

- b) Traumi. I traumi a cui può essere sottoposto un eritrocita possono avere diversa origine. Essi possono essere coinvolti nella turbolenza creata da protesi valvolari cardiache; oppure possono essere danneggiati da eccessiva pressione sulla superficie esterna del corpo; o anche da filamenti di fibrina quando questa si deposita intravascolarmente.
- c) Aumentata rigidità cellulare dovuta ad emoglobine anomale. Gli eritrociti che contengono molecole di emoglobina aggregate o precipitate sono meno deformabili e sono distrutti nel midollo, nella milza e nel microcircolo. Questo tipo di processo si ha nella drepanocitosi, in cui c'è un'aggregazione delle molecole di emoglobina che causa deformità cellulare, o in condizioni in cui c'è precipitazione dell'emoglobina con la produzione di corpi di Heinz rigidi. Quest'ultimo meccanismo si osserva nelle talassemie in cui vi è un'emoglobina instabile, e in cellule molto più sensibili a danni ossidativi, particolarmente quelli deficienti in glucosio-6-fosfato deidrogenasi.

### ■ Classificazione delle anemie emolitiche

Le cause di un'aumentata velocità di distruzione degli eritrociti sono spesso monofattoriali e nessuna classificazione è completamente soddisfacente. Un utile modo di affrontare il problema è quello di dividerle in:

- a) Anemie emolitiche congenite (dovute ad alterazioni genetiche che interessano la membrana o le vie metaboliche che producono energia o l'emoglobina).
- b) Anemie emolitiche acquisite (da alterazioni sia della membrana che del metabolismo).

## ■ Anemie emolitiche congenite

Si possono dividere in 3 gruppi:

- a) Anemie emolitiche da deficit enzimatici che causano un'anomalia del metabolismo energetico;
- b) Emoglobinopatie;
- c) Anemie emolitiche da alterazioni della membrana eritrocitaria.

Al primo gruppo appartengono disordini enzimatici sia delle vie degli esoso monofosfati che del ciclo di Embden-Meyerhof. Il risultato di questi difetti enzimatici è una particolare suscettibilità alle proprietà emolitiche di certi farmaci o un processo emolitico continuo che è chiamato *anemia emolitica congenita non sferocitica* (*Congenital Nonspherocytic Hemolytic Anemia: CNSHA*). Le emoglobinopatie che causano emolisi sono quelle associate con la presenza di emoglobine S, C ed E. Infine vi sono condizioni patologiche dovute a difetti primitivi nel metabolismo o nella struttura della membrana eritrocitaria.

- a) *Deficit enzimatici*. Gli enzimi i cui deficit possono essere associati ad anemia emolitica sono:
  1. Enzimi dello shunt degli esosomonofosfati e del metabolismo del glutatione:
    - glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G-6-PD)
    - glutatione perossidasi (GSH-Px)
    - deficit di GSH secondario a deficit di  $\gamma$ -glutammina-cisteina sintetasi
    - GSH-sintetasi
    - glutatione-reduttasi.
  2. Enzimi della via di Embden-Meyerhof:
    - esochinasi (HK)
    - glucosio-fosfato-isomerasi (GPI)
    - fosfofruttochinasi (PFK)
    - aldolasi (ALD)
    - trioso fosfato isomerasi (TPI)
    - difosfoglicerato mutasi (DPGM)
    - fosfoglicerato chinasi (PGK)
    - piruvato chinasi (pk).
  3. Enzimi del metabolismo dei nucleotidi:
    - adenilato chinasi
    - pirimidina 5'-nucleotidasi.

**Deficit della glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G-6-PD).** È molto frequente ed è un carattere patologico legato al cromosoma X. È stato stimato che ne sono affetti non meno di 100 milioni di persone.

La G-6-PD è essenziale per l'attività della via degli esoso monofosfati per cui la sua carenza lascia gli eritrociti poco protetti contro gli agenti ossidanti. La malattia è diffusa nella popolazione nera, nel bacino del Mediterraneo, Medio Oriente e Oriente. Vi sono vari tipi, elettroforeticamente diversi, di G-6-PD. Il tipo A differisce dal tipo B per una sostituzione aminoacidica, un residuo di asparagina al posto di uno di acido

aspartico. Una terza forma, la G-6-PD Hoectoen ha un'istidina al posto di una tirosina. Il tipo A è più comune nella razza nera, con fenotipo AB presente solo nel sesso femminile, mentre i maschi possono essere di tipo A o B. Nei bianchi è più comune il tipo B di cui sono state descritte almeno 50 varianti che, pur avendo la stessa mobilità elettroforetica, differiscono per altre caratteristiche fisico-chimiche (pH ottimale, Km, sensibilità al calore ecc.). Di queste varianti solo alcune si accompagnano a ridotta attività enzimatica. Nei neri la malattia è dovuta ad una variante di A, detta A-, molto instabile. Il preciso meccanismo dell'emolisi non è ben compreso. È possibile che il farmaco che la scatena causi formazione di  $H_2O_2$ , con conseguente ossidazione del glutatione e precipitazione dell'emoglobina in seguito alla formazione di ponti disolfuro tra i residui cisteinici della catena  $\beta$ .

L'emolisi è prevalentemente intravascolare. L'emoglobina precipitata produce corpi di Heinz e conseguente danno eritrocitario nella microcircolazione. Di qui emolisi spesso accompagnata ad emoglobinuria. I farmaci implicati sono soprattutto quelli ossidanti come le sulfonamidi, la primaquina, la nitrofurantoina, la fenacetina. Il deficit enzimatico si accompagna ad ittero neonatale ed a favismo, una reazione al legume *Vicia faba* che causa un episodio acuto di emolisi intravascolare. Tali episodi possono verificarsi negli ammalati anche durante infezioni intercorrenti, coma diabetico o in caso di malattie epatiche. Occasionalmente l'emolisi può essere continua, non scatenata dall'assunzione di farmaci: anemia emolitica congenita non sferocitica.

**Deficit di piruvato chinasi (PK).** Molte forme di anemia emolitica congenita non sferocitica possono essere causate da deficit di enzimi del ciclo di Embden-Meyerhof. La maggior parte di esse è rara. La più comune e meglio caratterizzata è dovuta a carenza di piruvato chinasi. Questo deficit si eredita come tratto autosomico recessivo e determina un'inefficiente produzione di ATP da parte degli eritrociti maturi, mentre i reticolociti conservano la funzione di fosforilazione ossidativa. La marcata riduzione dell'ATP è una delle maggiori cause di accorciamento della vita media degli eritrociti. Infatti, essa determina un deficit funzionale della pompa  $Na^+/K^+$  con la perdita di potassio che supera l'entrata del sodio. Si ha una diminuzione della pressione osmotica intracellulare con perdita di acqua, riduzione del volume eritrocitario e prematura distruzione nella milza e nel sistema reticolo endoteliale degli eritrociti. La PK agisce in una tappa avanzata della via di Embden-Meyerhof. La sua carenza porta ad un aumento del 2,3-DPG che sposta a destra la curva di dissociazione dell'ossigeno con conseguente buon compenso anche in caso di anemia molto marcata.

b) *Emoglobinopatie*

Mentre le talassemie sono riportabili ad alterazioni di tipo quantitativo, cioè a mancata incompleta sintesi delle catene globiniche della HB, le emoglobinopatie sono caratterizzate da alterazioni strutturali, cioè da difetti di tipo qualitativo di queste catene, che possono essere ereditarie o acquisite.

**Anemie falciformi o Drepanocitosi.** Sono malattie ereditarie causate da modificazioni nella sequenza aminoacidica delle catene globiniche della emoglobina, conseguenti a mutazioni geniche. In questo paragrafo saranno considerate soltanto le emoglobinopatie a più estesa diffusione, anche se bisogna tenere presente che fino ad ora sono state identificate più di 400 tipi di emoglobine con sequenza aminoacidica modificata.

Le mutazioni vengono trasmesse come carattere autosomico recessivo per cui la malattia colpisce soltanto gli omozigoti; gli eterozigoti, quindi, non manifestano sintomi o li presentano generalmente in maniera attenuata. Le prime varianti emoglobiniche individuate vennero indicate con le lettere dell'alfabeto, le successive col nome della città in cui si trovavano i pazienti che ne erano portatori. Alcune mutazioni provocano la scomparsa di un aminoacido in una catena globinica, ma la maggior parte di esse provoca la sostituzione di un aminoacido con un altro. Alcune varianti emoglobiniche non provocano alcuna sintomatologia nei soggetti omozigoti, mentre altre, ne determinano la comparsa ed in forma grave.

La malattia si manifesta con grave anemia, con crisi emolitiche talora gravi, con splenomegalia e con danni a vari organi. La diagnosi di emoglobinopatia, che inizialmente veniva posta sulla base delle variazioni della mobilità elettroforetica dell'emoglobina, si avvale oggi delle tecniche di biologia molecolare.

Le emoglobinopatie più importanti sono definite anemie falciformi o anemie drepanocitiche o drepanocitosi (dal greco *δρεπανον* = falce) per il fatto che le emazie assumono una forma a falce. La forma più diffusa è dovuta alla presenza della variante emoglobinica S, così definita dalla parola inglese *sickle* = falce, molecularmente contraddistinta dalla sostituzione di

catena $\beta$ normale	sequenza aminoacidi	pro	glu	glu
	sequenza genetica di basi	CCT	GAG	GAG
catena $\beta$ patologica	sequenza genetica di basi	CCT	GTG	GAG
	sequenza aminoacidi	pro	val	glu

**FIG. 60.32** Patologia molecolare nella sintesi dell'emoglobina S. La mutazione del gene  $\beta$ -globinico, mappato nel braccio corto del cromosoma 11, consiste nella trasversione Adenina  $\rightarrow$  Timina nel secondo nucleotide del codone 6, che determina nella catena  $\beta$  della molecola emoglobinica la sostituzione dell'acido glutammico con la valina.

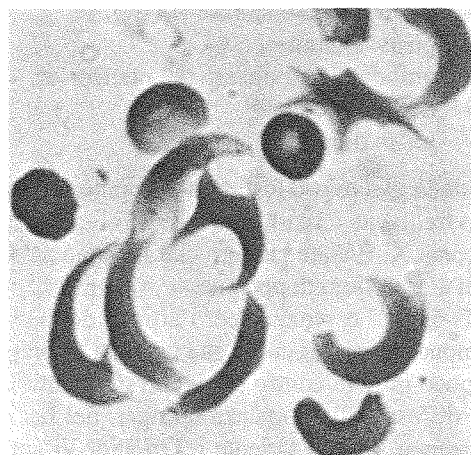
un residuo di acido glutammico con un residuo di valina in posizione 6 nella catena  $\beta$ , causata dalla mutazione puntiforme GAG  $\rightarrow$  GTG del codone 6 del gene  $\beta$ -globinico (Fig. 60.32). Si ritiene che la mutazione sia comparsa in alcune regioni dell'Africa centrale e che la sua enorme diffusione sia stata causata dal fatto che i portatori di essa assumono la capacità di non contrarre la malaria. È stato notato che attualmente nelle suddette regioni i portatori sani della mutazione (eterozigoti) rappresentano circa il 25% dell'intera popolazione.

Nell'emoglobina S deossigenata i tetrameri che la costituiscono interagiscono tra loro formando polimeri che assumono una disposizione parallela formando dei precipitati definiti *tattoidi*. Questo evento si riflette in alterazioni della membrana che fanno assumere agli eritrociti l'aspetto a falce (Fig. 60.33). Questa emoglobinopatia, che viene trasmessa con meccanismo autosomico recessivo, può presentarsi nella:

- forma eterozigote per la HbS (tratto A-S),
- forma omozigote per la HbS (tratto S-S),
- forma eterozigote per la HbS combinata con le emoglobine C, D, E (tratti S-C, S-D, S-E), o con altre varianti strutturali.

Il fenomeno della falcizzazione si accompagna a:

1. aumento della fragilità meccanica e diminuzione della sopravvivenza (e quindi emolisi cronica);
2. aggregazione degli eritrociti falciformi, particolarmente nel microcircolo, con aumento della viscosità del sangue, rallentamento del flusso, aumento del fenomeno della falcizzazione per la ulteriormente prolungata deossigenazione, fino al blocco completo dei piccoli vasi con danni e microinfarti tissutali. Questo si verifica particolarmente nelle aree scarsamente vascolarizzate, quali la testa dell'omero e del femore, con conseguenti necrosi asettiche.



**FIG. 60.33** Anemia microdrepanocitica. Tipico aspetto a falce delle emazie. (Da Larizza-Grignani-Martelli, *Diagnostica delle malattie del sangue*, Piccin).

Gli episodi vascolari occlusivi sono alla base delle "crisi" dolorose che si hanno nel decorso della malattia.

**Altre varianti di emoglobinopatie.** L'emoglobina C differisce da Hb A per la sostituzione della lisina al posto dell'acido glutammico in posizione  $\beta$  6 (mutazione GAG  $\rightarrow$  AAG). La Hb C è meno solubile di Hb A e gli eritrociti che contengono questa variante sono meno deformabili della norma. Questo è, con tutta probabilità, la causa della loro minore sopravvivenza. Un'altra emoglobina patologica è la E, caratterizzata dalla sostituzione nella catena globinica  $\beta$  dell'acido glutammico con la lisina a livello del codone 26.

**Le emoglobine instabili.** Sono disordini rari dovuti alla sostituzione di aminoacidi nella regione della tasca dell'eme, nel sito che lega l'eme o in aree critiche che causano distorsione della molecola. In alcuni casi queste varianti di emoglobina sono il risultato della delezione di uno o più aminoacidi, con produzione di una catena globinica instabile che tende a precipitare negli eritrociti con formazione di inclusioni rigide (corpi di Heinz). Questo causa danno alla membrana quando gli eritrociti sono spinti nei sinusoidi splenici o nel microcircolo di altri organi.

Le circa 250 mutazioni responsabili della comparsa di emoglobine instabili sono trasmesse con meccanismo autosomico dominante per cui anche gli eterozigoti esibiscono la sintomatologia, la cui gravità varia a seconda del tipo di sostituzione aminoacidica presente nella catena globinica. Sono state identificate diverse emoglobine instabili, tra le quali si ricordano la Hb Torino, la Hb Hirosaki, la Hb Hammersmith, la Hb Zurich, la Hb Bethesda, la Hb-Reiner, la Hb Ford.

**Le metaemoglobinopatie.** Queste emoglobinopatie, che possono essere ereditarie o acquisite, sono contraddistinte dalla presenza nei gruppi eme di ferro ossidato allo stato trivalente ( $\text{Fe}^{3+}$ ), invece che allo stato bivalente ( $\text{Fe}^{2+}$ ), come avviene nell'emoglobina normale. In queste condizioni l'Hb, che viene definita metaemoglobina o Hb M, perde la capacità di legare l'ossigeno e conseguentemente quella di trasportarlo e di cederlo ai tessuti, donde comparsa di ipossia tissutale. In condizioni fisiologiche si forma una piccola quantità di HbM (1,5-2% del totale), che però viene prontamente ridotta dalla metaemoglobina reductasi (NADH citocromo  $b_5$  reductasi).

L'aumento della concentrazione di HbM negli eritrociti nelle metaemoglobinopatie o metaemoglobinemie, si verifica in due condizioni:

1. il deficit di metaemoglobina reductasi (metaemoglobinopatia familiare), nella quale la concentrazione di HbM può raggiungere il livello del 30-40%,
2. la metaemoglobinopatia propriamente detta, della quale sono state identificate diverse varianti, che si

diversificano tra loro per la diversa posizione in cui l'aminoacido istidina della catena globinica viene sostituito dalla tirosina o dall'acido glutammico. Queste modificazioni della sequenza aminoacidica della globina, che vanno incluse tra quelle che caratterizzano le emoglobinopatie, fanno sì che nella Hb il ferro eminico persista allo stato ossidato di  $\text{Fe}^{3+}$ , per cui la Hb assume tutte le caratteristiche della HbM.

Le forme acquisite sono da imputare all'esposizione a tossici ossidanti (ad es. nitrati, clorato di potassio, nitrobenzene, fenoli, nitrocomposti).

#### e) *Disordini genetici della membrana eritrocitaria.*

##### 1. Sferocitosi ereditaria.

Questo disordine, relativamente comune, è ereditato con tratto autosomico dominante. Un difetto genetico della membrana, non ancora chiarito a livello molecolare ma coinvolgente le molecole di spettina o di anchirina, determina alcune anomalie metaboliche ben definite:

- aumento della permeabilità al sodio con aumento della velocità della glicolisi, che deve fornire maggior energia per pompare l'eccesso di sodio fuori dalla cellula;
- alterazione della normale composizione lipidica della membrana che è causa di prematura distruzione degli eritrociti quando sono ammassati nella microcircolazione della milza;
- modificazione del citoscheletro dovuta ad una alterata interazione spettina-proteina 4.1 per un difetto a livello della spettina. La conseguenza è un citoscheletro friabile ed un'instabilità della membrana.

Tutto questo è alla base della forma sferica che gli eritrociti hanno in circolo e della loro maggiore sensibilità alla lisi in soluzioni ipotoniche (resistenza globulare).

2. Elliptocitosi. È trasmessa come carattere autosomico dominante ed è caratterizzata dalla presenza di emazie ellittiche o ovali nel sangue periferico in proporzione variabile. In molti casi non ha importanza clinica e non si accompagna ad emolisi; talvolta, però, si accompagna ad anemia emolitica severa con splenomegalia. Vi sono due varianti genetiche di cui una, quella associata con emolisi, è legata al locus genetico del gruppo sanguigno Rh. Alcune forme di elliptocitosi ereditaria sono dovute a deficit della proteina 4.1 del citoscheletro.
3. Acantocitosi (eritrociti crenati). È associata con l'assenza di  $\beta$ -lipoproteine nel siero. Non sono note le cause della malattia, che si accompagna a sindrome da malassorbimento, coinvolgimento del sistema nervoso centrale e retinite pigmentosa.



4. Stomatocitosi. C'è un'alterazione della membrana dovuta, sembra, ad alterazione della banda 3.
5. Piroipoichilocitosi ereditaria. È una condizione patologica dovuta a modificazioni di struttura della spettrina.

#### ■ Anemie emolitiche acquisite

Le anemie emolitiche acquisite possono classificarsi in:

- a) Anemie emolitiche su base immunitaria:
  1. da autoanticorpi.
  2. da isoanticorpi: malattia emolitica del neonato
  3. da trasfusioni con sangue incompatibile
- b) Anemie emolitiche su base non immunitaria:
  1. da alterazioni acquisite della membrana eritrocitaria
  2. da traumi
  3. da agenti chimici e fisici
  4. da agenti infettivi
  5. multifattoriali.

#### *Anemie emolitiche su base immunitaria*

Possono essere provocate da autoanticorpi e da isoanticorpi diretti verso antigeni eritrocitari e possono essere distinte nella maniera sottoindicata.

**Anemie emolitiche autoimmuni.** Le anemie emolitiche autoimmuni sono caratterizzate dalla produzione di autoanticorpi diretti contro antigeni della membrana eritrocitaria con conseguente riduzione della sopravvivenza dei globuli rossi. Possono essere distinte in due principali categorie:

- a) anemie emolitiche autoimmuni da anticorpi caldi, indotte, generalmente, da autoanticorpi IgG, che interagiscono con la membrana eritrocitaria a temperatura corporea;
- b) anemie emolitiche autoimmuni da anticorpi freddi, caratterizzate dalla presenza di IgM che reagiscono meglio con i determinanti eritrocitari a bassa temperatura.

#### ■ Anemie emolitiche autoimmuni da anticorpi caldi

Gli anticorpi coinvolti sono nel 90% IgG. Sono solitamente policlonali. La specificità è nel 70-80% dei casi per gli antigeni eritrocitari Rh (generalmente anti-E, raramente anti-D), ma sono state descritte specificità anti-Le ed anti-Lu. Possono suddividersi ulteriormente in due gruppi:

- a) forme primarie o idiopatiche, in cui l'anemia non è associata ad alcuna malattia;
- b) forme secondarie. L'anemia è associata ad una malattia sistemica (linfomi, leucemia linfatica cronica, lupus eritematoso sistemico, malattie vascolari del

collagene). Il 40% dei pazienti con forma idiopatica presenta una porpora trombocitopenica autoimmune in associazione all'anemia (*Sindrome di Evans*).

#### ■ Anemie emolitiche autoimmuni da autoanticorpi freddi

Si tratta generalmente di IgM. Possono essere sia mono- che policlonali. Sono diretti contro antigeni del sistema I/i, del sistema Pr o antigeni Gd. Un anticorpo è definito anti I quando interagisce più fortemente con le emazie di un adulto che con quelle di un neonato. Al contrario, specificità anti i è data quando l'anticorpo reagisce più intensamente con le emazie del cordone ombelicale che con quelle dell'adulto.

Il meccanismo di distruzione dei globuli rossi da parte delle due maggiori classi di anticorpi ha una fisiopatologia differente. Gli *anticorpi caldi* sono IgG 7S attivi massimamente a 37 °C. Non agglutinano gli eritrociti e di solito non fissano né attivano il complemento. Sono perciò classificati come anticorpi incompleti.

Essi non causano alterazioni morfologiche o metaboliche degli eritrociti e di solito non hanno specificità per gli antigeni dei gruppi sanguigni ABO ma possono averne per gli antigeni Rh. Causano distruzione degli eritrociti nella milza ed in altre parti del sistema reticolo endoteliale e spesso producono sferocitosi marcata. Il meccanismo della distruzione cellulare è complicato e probabilmente multifattoriale.

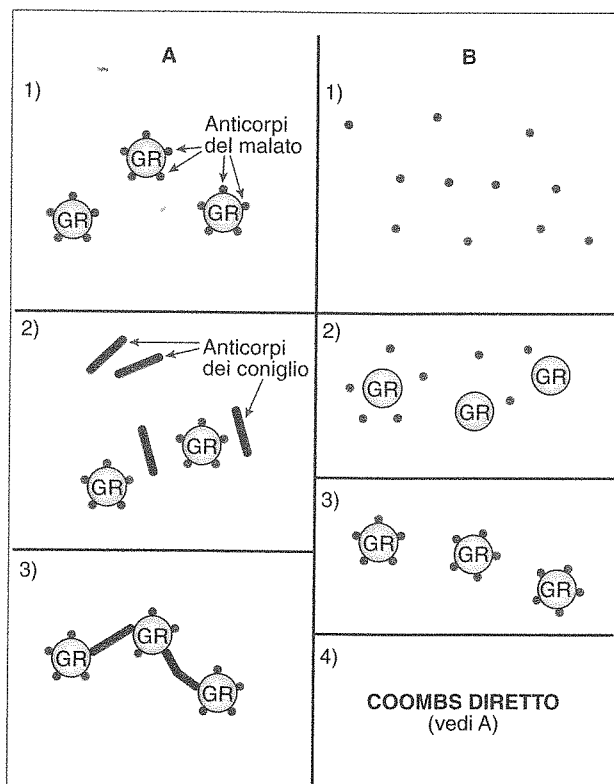
Le cellule rivestite da anticorpi aderiscono ai macrofagi della milza che hanno recettori specifici per le sottoclassi IgG1 ed IgG3 per cui possono perdere parte della loro membrana in un processo che porta a formazione di sferociti.

Gli *anticorpi freddi* sono di solito IgM 19S che hanno una temperatura ottimale intorno a 4 °C. Gli anticorpi freddi sono completi, cioè causano agglutinazione macroscopica e microscopica. Questi anticorpi attivano il complemento, e gli eritrociti possono essere ricoperti di C<sub>3</sub> e sequestrati dal sistema reticolo endoteliale, particolarmente nel fegato. La fissazione del complemento comincia con l'attivazione della sequenza da parte del complesso antigene-anticorpo.

La via classica è di solito innescata attraverso i componenti C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub>, e C<sub>2</sub>. La lisi avviene quando l'intero sistema è stato attivato fino a C<sub>9</sub> e produce fori nella membrana che sono visibili al M.E. Questi buchi sono di 80-100 Å di diametro e quindi larghi abbastanza per permettere il passaggio dell'emoglobina e causare emolisi intravascolare.

È interessante il fatto che la sequenza di attivazione del complemento è spesso interrotta a C<sub>3</sub>, anche se le cause di questo fenomeno non sono note.

La presenza di anticorpi antieritrocitari può essere individuata con il *test di Coombs*. Nella sua forma più semplice (test di Coombs diretto) si fa reagire un siero anti γ globuline eterologo ad emazie lavate. Le cellule



**FIG. 60.34** Test di Coombs. A: DIRETTO. 1) I globuli rossi (GR) del malato sono già ricoperti di anticorpi  $\gamma$ -globuline umane anti - G.R. 2) Si aggiunge un anticorpo di coniglio ( $\gamma$ -globulina di coniglio anti  $\gamma$ -globulina umana). 3) Questo anticorpo aggiunto riconosce le  $\gamma$ -globuline e si dispone a ponte tra quelle che si trovano su differenti G.R., provocando l'agglutinazione. B: INDIRETTO. 1) Gli anticorpi sono liberi nel siero del malato. 2) Si aggiunge questo siero su G.R. che portano gli antigeni supposti corrispondenti a tali anticorpi. 3) Gli anticorpi si fissano sui siti antigenici sui G.R. 4) Resta da eseguire un test di Coombs diretto.

ricoperte con anticorpi caldi (incompleti) sono agglutinate (Fig. 60.34).

Se si vogliono ricercare anticorpi anti emazie nel siero, si usa il test di Coombs indiretto. Eritrociti normali di gruppo O sono prima incubati con il siero in esame, poi si fa il Coombs diretto (Fig. 60.34). Dosaggi RIA più precisi e sensibili sono stati messi a punto per poter rilevare la presenza anche di piccole concentrazioni di anticorpi sulla superficie delle emazie.

### ■ Eziopatogenesi

Le anemie emolitiche autoimmuni sono determinate da autoimmunizzazione contro eritrociti autologhi. Sono state formulate tre ipotesi eziopatogenetiche:

- gli antigeni eritrocitari sono alterati e quindi resi immunogenici dall'azione di sostanze chimiche, di enzimi batterici o dall'incorporazione di antigeni virali o batterici;
- gli autoanticorpi sono in realtà diretti contro antigeni eterologhi e reagiscono crociatamente con gli antigeni eritrocitari;

- rottura della tolleranza immunologica con formazione di autoanticorpi contro gli antigeni eritrocitari.

Un breve cenno meritano le *anemie emolitiche autoimmuni da anticorpi caldi indotte da farmaci*. Vi è una lunga lista di farmaci in grado di causare emolisi su base immunitaria. Si riconoscono nella patogenesi almeno tre distinti meccanismi:

- il farmaco funge da aptene, determinando la produzione di anticorpi che interagiscono con gli eritrociti su cui esso è adsorbito. La causa più comune di questo tipo di reazione è la somministrazione di dosi massive di penicillina;
- il farmaco determina una risposta immune con produzione di anticorpi della classe delle IgM. Ad una successiva somministrazione, i complessi farmaco-anticorpo che si formano sono capaci di interagire con le membrane eritrocitarie con l'intervento dei componenti del complemento. La reazione emolitica può essere drammatica, con emolisi intravascolare ed emoglobinemia secondaria ad una seconda somministrazione del farmaco;
- il farmaco può causare una vera e propria anemia emolitica autoimmune. Questo è il caso dell'antipertensivo metildopa. Circa il 20% dei pazienti in trattamento continuato con metildopa sviluppa anticorpi caldi (IgG) strettamente diretti contro gli antigeni Rh.

Altre forme di malattie emolitiche sono le seguenti:

**Malattia emolitica isoimmune del neonato.** Si tratta di un gruppo di condizioni patologiche che sono la conseguenza del passaggio transplacentare di anticorpi materni diretti verso antigeni eritrocitari fetali con distruzione degli eritrociti durante la vita fetale (incompatibilità Rh, incompatibilità ABO). Per una dettagliata descrizione si rimanda ai testi di Immunologia e Immunopatologia.

**Anemie emolitiche da trasfusioni con sangue incompatibile.** Si rimanda, per una dettagliata descrizione dell'eziopatogenesi di queste anemie, al capitolo sui gruppi sanguigni.

### *Anemie emolitiche non immuni acquisite*

Gli eritrociti possono essere prematuramente distrutti attraverso l'azione di stress meccanici, agenti chimici, infezioni o alterazioni acquisite della membrana. Vi sono tre meccanismi attraverso cui gli eritrociti possono essere danneggiati da un trauma:

- aumentata rigidità della parete vasale, associata con turbolenza o altre anomalie del flusso,
- malattie dei vasi della microcircolazione,
- trauma diretto in aree esposte.

Il primo caso si verifica di solito a causa di valvole cardiache artificiali o alterate. Il secondo nelle micro-

angiopatie da arteriti, necrosi fibrinoide, invasione metastatica dei capillari. Il terzo caso si può verificare, ad esempio con emoglobinuria, negli esercizi fisici prolungati, come lunghe corse o marce su superfici accidentate.

La membrana degli eritrociti può essere alterata nell'emoglobinuria parossistica notturna. Questa è una rara malattia (prevalenza = 1/500.000), dovuta all'espansione clonale di uno o più precursori emopoietici midollari, colpiti da mutazioni somatiche a carico del gene PIG-A, mappato sul cromosoma X (Xp22.1), e caratterizzata essenzialmente da grave anemia emolitica e da fenomeni trombotici. Sono state identificate un'ottantina di diverse mutazioni che diventano responsabili di alterazioni della membrana eritrocitaria e talora anche di quella di altre popolazioni cellulari ematiche a seconda del livello maturativo raggiunto dall/i precursore/i emopoietico/i bersagliato/i dall'evento mutazionale. L'emoglobina, liberata dalla lisi eritrocitaria intravascolare, oltrepassa il filtro renale e passa nelle urine, specialmente in quelle emesse nelle ore notturne o nel primo mattino, che assumono una colorazione scura. L'emoglobinuria, che può associarsi ad ittero, non è continua ma episodica: le crisi emolitiche, difatti, appaiono associate a fenomeni stressanti di vario tipo.

Le mutazioni a carico del gene PIGA-A sono inattivanti per cui bloccano la sintesi del prodotto da esso codificato, che è una proteina che partecipa alla sintesi del glicosilfosfatoinositolo (GFI), un costituente della membrana plasmatica cellulare, che insieme alla fosfoetanolamina e ad un glicano forma un sistema di ancoraggio, che presiede alla fissazione sulla membrana di numerose proteine, che esercitano su di essa un'azione protettiva nei riguardi sia del sistema del complemento che di altri agenti lesivi. La mancata o ridotta sintesi del glicosilfosfatoinositolo, quindi impedisce, riduce o altera la formazione di questo sistema di ancoraggio per proteine con la conseguenza che la cellula diventa ipersensibile a tutti gli stimoli che ledono l'integrità della membrana plasmatica cellulare, donde la facilità con cui gli eritrociti vanno incontro ad emolisi intravascolare. Alcuni autori sostengono che le crisi emoglobinuriche si verificano preferenzialmente di notte perché il complemento interagisce più facilmente con la membrana eritrocitaria in questo periodo della giornata durante il quale il pH del plasma raggiunge i livelli più bassi. L'anomalia interessa anche le cellule della serie bianca che derivano dal clone mutato. La terapia risolutiva della malattia è data dal trapianto del midollo.

## 60.5 Policitemie

I termini *policitemia* e *poliglobulia* vengono impiegati per definire quelle condizioni morbose che sono caratterizzate da un aumento degli eritrociti, dell'emoglobina e dell'ematocrito. Di solito il termine *policitemia* viene riservato al *morbo di Vaquez*, mentre il termine di *poliglobulia* viene impiegato per tutte le condizioni morbose in cui l'aumentata produzione di

eritrociti non è dovuta primitivamente ad un'abnorme proliferazione midollare. Per tutte queste condizioni si può usare il termine di eritrocitosi.

Si parla di *policitemia* o *eritrocitosi* relativa (o *pseudoeritrocitosi*) quando l'aumento del numero degli eritrociti, dell'emoglobina e dell'ematocrito non si associa ad aumento della massa eritrocitaria totale, ma è dovuto ad una riduzione del volume plasmatico. Si parla di *eritrocitosi* assoluta quando l'aumento è reale, vale a dire quando la massa eritrocitaria è superiore a 32 ml/kg nella donna e a 36 ml/kg nell'uomo.

### 60.5.1 Policitemia assoluta

Può essere primaria o *policitemia vera* e secondaria ad una varietà di condizioni associate ad una iperproduzione di eritropoietina.

#### ■ Policitemia vera o morbo di Vaquez

Rientra nel gruppo di malattie che possono essere definite disordini mieloproliferativi, caratterizzati da un'abnorme proliferazione degli elementi figurati del sangue. I globuli rossi, i globuli bianchi e le piastrine possono essere coinvolti in ogni combinazione possibile. Questi disordini abbracciano un vasto spettro di condizioni patologiche, che vanno dalla *policitemia vera* alla *trombocitemia essenziale*, alla *leucemia mieloide cronica* e alla *mielosclerosi*. La *policitemia vera* è dovuta ad un'abnorme proliferazione dei precursori degli eritrociti di derivazione monoclonale probabilmente da una cellula staminale. Le cause di questa anomalia proliferativa non sono note. Nel corso della malattia si può avere abnorme proliferazione di tipo neoplastico anche dei precursori delle piastrine e dei globuli bianchi. La *policitemia vera* può sfociare in una marcata reazione fibrotica del midollo con progressione verso la *mielosclerosi* o terminare in una *leucemia mieloblastica acuta*.

#### ■ Policitemia assoluta secondaria

L'iperproduzione di eritropoietina che caratterizza questo gruppo di *poliglobulie* può essere inappropriata e verificarsi in condizioni di normale ossigenazione dei tessuti o dipendere da una ipossia tissutale. Quest'ultima può essere la conseguenza del soggiorno a grandi altezze, di malattie cardio-polmonari croniche, di shunt destro-sinistro, di riduzione della ventilazione alveolare. La bassa pressione di ossigeno a notevoli altezze diminuisce la saturazione dell'ossigeno arterioso (vedi Cap. 4). In seguito ad una veloce ascesa ad elevate altitudini, c'è un aumento della gittata cardiaca e della ventilazione che risulta in una riduzione del gradiente di ossigeno tra l'atmosfera e l'aria alveolare, ma causa anche un certo grado di alcalosi. L'effetto dell'alcalosi è lo spostamento a sinistra della curva di dissociazione dell'ossigeno. Entro 24 ore dall'ascesa, comunque, c'è un aumento nella concentrazione di 2,3-DPG e di ATP che spostano la curva a destra

e quindi facilitano il rilascio di ossigeno ai tessuti. Dopo pochi giorni c'è una reticolocitosi e quindi un aumento dell'ematocrito e del volume totale di sangue.

Malattie polmonari croniche, shunt destro-sinistro ed ipoventilazione alveolare possono essere associate con cianosi e desaturazione dell'ossigeno arterioso e con un aumento dell'ematocrito dovuto alla stimolazione dell'eritropoiesi da ipersecrezione di eritropoietina.

Un aumento della produzione di eritropoietina, inappropriata rispetto alla saturazione arteriosa dell'ossigeno, è un'occasionale causa di policitemia. Poiché il rene è la maggiore sorgente di eritropoietina nell'adulto, essa è spesso la conseguenza di lesioni renali (cisti, ipernefroma, idronefrosi, etc.), ma può ritrovarsi anche in altre condizioni patologiche (epatoma, emangioma cerebellare, miomi uterini, feocromocitoma, morbo di Cushing, etc.). Infine vi è una forma di policitemia familiare da iperproduzione autonoma di eritropoietina.

### 60.5.2 Policitemia tardiva

Accanto a situazioni classiche in cui la riduzione del volume plasmatico è evidente (ustioni, diarree profuse, shock, sudorazioni abbondanti e protratte), un posto particolare spetta alla poliglobulia da stress (*sindrome di Gaisbock*), che si accompagna ad ipertensione. Anche qui la massa eritrocitaria non è aumentata né vi è aumento della produzione eritrocitaria midollare, ma solo riduzione del volume plasmatico.

## 60.6 Modificazioni qualitative e quantitative dei leucociti

### 60.6.1 Leucopoiesi e piastrinopoiesi

In condizioni fisiologiche nessuno dei precursori emopoietici passa dal midollo osseo nel sangue, la cui costituzione cellulare è stata descritta all'inizio di questo capitolo.

I primi precursori *committed* dei granulociti e dei monociti sono rispettivamente i *mieloblasti* ed i *monoblasti*, dai quali derivano, a seconda degli stimoli ad essi apportati dai fattori di crescita emopoietici, i *promielociti* ed i *promonociti*, che rappresentano rispettivamente i capostipiti della serie granulocitica (neutrofili, eosinofili e basofili) e dei monociti (Fig. 60.35).

Nel promielocita cominciano a comparire i granuli, definiti primari, che diventano più evidenti nella tappa maturativa successiva, rappresentata dal mielocita, che pertanto è già distinguibile nelle tre forme (neutrofilo, eosinofilo, basofilo) in quanto in ognuna di queste è evidente la differente colorazione dei granuli. Questi progenitori sono dotati di attività proliferativa che consente ad essi di espandersi ed è per tale ragione che essi sono inclusi nel compartimento proliferativo. La tappa maturativa successiva a quella mielocitica comporta la formazione del metamielocita, che è sfornito di attività proliferativa e sotto

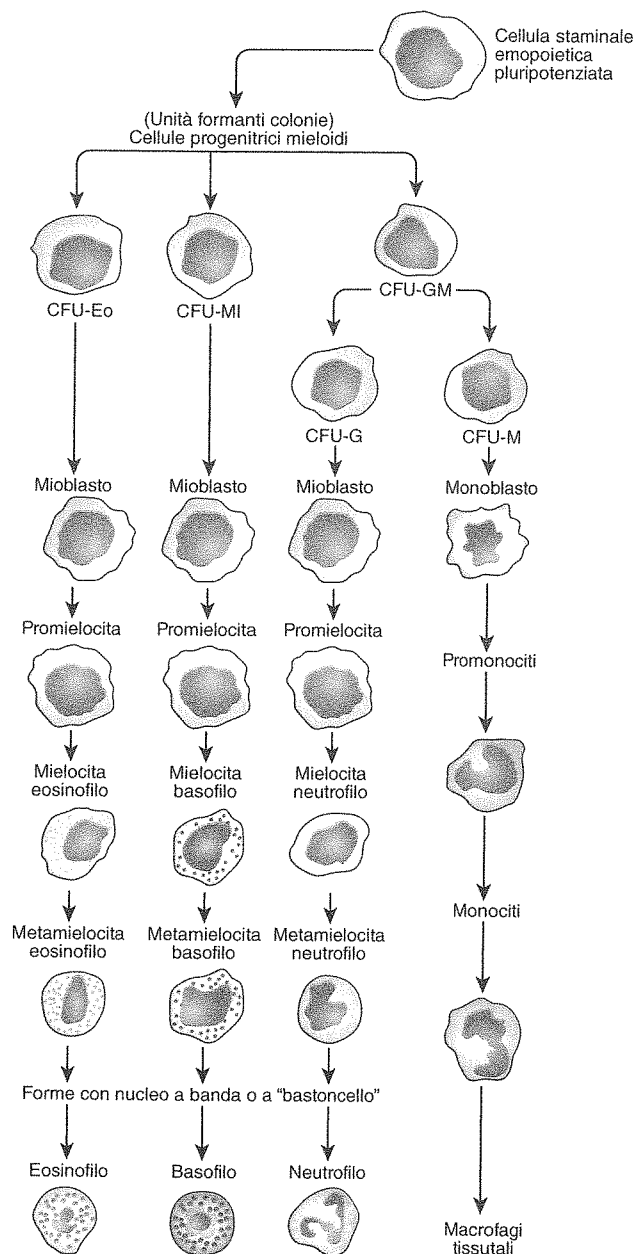


FIG. 60.35 Leucitopoiesi.

l'aspetto morfologico presenta nel nucleo un'incisione superficiale, preludio della successiva lobatura, che caratterizza il nucleo dei granulociti maturi, nel cui citoplasma sono presenti i granuli che col metodo di May-Grunwald-Giemsa si colorano in rosa pallido nei neutrofili, in rosa intenso negli eosinofili ed in bleu nei basofili.

Il processo maturativo dei granulociti si svolge in 6-10 giorni e si conclude con l'immissione nel sangue dei granulociti maturi, cioè di cellule che esibiscono un nucleo plurilobato. Essi restano in parte marginati alla parete endoteliale dei vasi (per cui non vengono inclusi nella formula leucocitaria) ed in parte permangono nel sangue per 10-15 ore; trascorso tale periodo essi, migrano nei tessuti dove sopravvivono per circa una settimana.

La *monocitopoiesi* si svolge alquanto più rapidamente della granulocitopoiesi; dal promonoblasto, si forma il promonocita, che in un'ulteriore tappa maturativa forma il monocita, che passa nel sangue, dove permane per circa un giorno per poi passare nei tessuti dove si differenzia in macrofago, che ha una durata media di vita molto lunga, cioè di mesi ed anche di anni. A seconda degli organi in cui è avvenuta la loro differenziazione, i macrofagi acquisiscono specifiche proprietà: ad es. nel tessuto osseo diventano osteoclasti, nel fegato cellule di Kupffer, nella cute cellule dendritiche.

La *piastrinopoiesi* è il processo differenziativo midollare che porta alla formazione delle piastrine. Dai progenitori derivati dalle cellule staminali emopoietiche si formano dapprima i *megacarioblasti*, che inizialmente proliferano e quindi si differenziano in megacariociti che formano le colonie CFU-Mk. Il fattore di crescita che prevalentemente regola la produzione dei megacariociti è la trombopoietina, sintetizzata dalle cellule del fegato e da quelle del rene. Sotto la sua azione e sotto quella dell'IL-11 ciascun megacariocita si frantuma in circa 4.000 frammenti cellulari anucleati, che sono le *piastrine* o *trombociti*, che sono versati nel sangue. Si ritiene che il meccanismo omeostatico che regola la concentrazione delle piastrine nel sangue (250.000-400.000/ml) si basi sul fatto che questi elementi esprimono sulla loro superficie recettori per questo fattore di crescita con la conseguenza che allorché il loro numero si riduce, una maggiore quantità di trombopoietina resta libera e viene captata dai recettori espressi dai megacarioblasti ed, al contrario, quanto più elevata è la loro concentrazione nel sangue, tanta più trombopoietina viene perifericamente bloccata. Le funzioni piastriniche saranno illustrate nel capitolo sull'emostasi a cui si rimanda.

### 60.6.2 Variazioni del numero dei neutrofili

#### ■ Neutrofilia

Un aumento del numero dei neutrofili circolanti (*neutrofilia* o *leucocitosi neutrofila*) è di solito dovuto ad un incremento della loro produzione, necessario per fronteggiare un'infezione. Il numero dei leucociti può crescere fino a 30.000 ed oltre con predominanza di neutrofili. La neutrofilia si può accompagnare ad ogni tipo di disordine associato a necrosi e danno tissutale, come ad esempio i tumori maligni, l'infarto, malattie collageno-vascolari. Essa può poi riflettere sia un'alterazione della distribuzione tra *pool* leucocitario marginato e *pool* circolante, come si ha con alcuni farmaci (demarginazione da glucocorticoidi), sia una mobilitazione dai *pool* midollari di deposito (ad esempio da eziocolanalone), sia una stimolazione della granulopoiesi (litioterapia).

I linfociti ed i macrofagi attivati dagli antigeni e dai lipolisaccaridi batterici, sintetizzano e rilasciano IL-1 e TNF, che interagendo con gli specifici recettori espressi dalle cellule endoteliali, dai fibroblasti, dagli stessi linfociti e dagli stessi macrofagi, stimolano tali cellule a sintetizzare ed a secernere fattori di crescita emopoietici, quali il *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF)*, il *Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)*, il *Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF)* e l'*Interleuchina 6 (IL-6)* che nel midollo osseo agiscono sinergicamente e stimolano la differenziazione dei progenitori mieloidi in direzione dei granulociti neutrofili.

#### ■ Neutropenia

Si parla di neutropenia quando il numero dei neutrofili circolanti scende al di sotto di 1.500/ $\mu$ l. Una mancanza totale di neutrofili circolanti prende il nome di agranulocitosi. La conseguenza della neutropenia è un'aumentata suscettibilità alle infezioni batteriche. L'infezione è comunemente dovuta ai microrganismi che in condizioni normali colonizzano la pelle ed il tratto gastrointestinale. La neutropenia è di solito conseguenza della ridotta proliferazione dei precursori mieloidi dovuta a:

- leucemia acuta (sia alla stessa malattia che alla terapia);
- somministrazione di farmaci per il trattamento di neoplasie maligne;
- radiazioni ionizzanti, idiosincrasia verso particolari farmaci (fenotiazina, tiouracile, fenilbutazone, idantoina, etc.).

Più raramente la neutropenia è dovuta ad aumento della distruzione periferica dei leucociti, in genere da anticorpi. La distruzione immune dei neutrofili può avvenire per molte ragioni, ma non è frequente. Nei neonati può essere transitoria e su base isoimmunitaria come conseguenza del passaggio transplacentare di anticorpi citotossici della madre. Una neutropenia su base immunitaria può essere dovuta ad alcuni farmaci, come la aminopirina ed il metiltiouracile. Anche il fenilbutazone, oltre alla sua azione midollare, può agire con questo meccanismo. I farmaci funzionano probabilmente da apteni che, combinandosi con ignoti antigeni leucocitari, determinano la produzione di anticorpi verso il complesso farmaco-antigene. Autoanticorpi anti-neutrofili sono stati chiamati in causa per la neutropenia che caratterizza l'artrite reumatoide, il *lupus erythematosus* sistemico e la sindrome di Felty (artrite reumatoide con splenomegalia).

Una terza causa di neutropenia è l'aumento della marginazione dei granulociti. Questo può verificarsi in seguito a contatto del sangue con una superficie artificiale come la membrana dell'emodialisi o come

i filtri di nylon usati per raccogliere i granulociti per le trasfusioni. L'esatto meccanismo patogenetico non è chiaro, ma si suppone che il complemento, attivato per contatto probabilmente attraverso la via alternativa con la superficie, causi un'aggregazione dei leucociti mediata da  $C_{5a}$  con loro marginazione e sequestro a livello polmonare.

Alcune neutropenie sono congenite. La prima ad essere riconosciuta è stata l'*agranulocitosi genetica infantile di Kostman*, caratterizzata da neutropenia (variabile da modesta a grave) presente dalla nascita ed associata ad una forte tendenza alle infezioni. Apparentemente vi è un difetto nella maturazione granulocitaria poiché nel midollo si ritrova un aumentato numero di precursori dei granulociti.

La *disgenesia reticolare con aleucocitosi congenita* è caratterizzata da granulocitopenia alla nascita associata con assenza della produzione di immunoglobuline.

Una forma molto interessante è la *neutropenia ciclica* in cui vi è una riduzione periodica dei neutrofili. Questa forma è trasmessa con carattere autosomico dominante. I pazienti affetti lamentano una storia di infezioni ricorrenti, spesso datate dalla prima infanzia. Una conta dei granulociti dimostra una neutropenia con cicli di 14-21 giorni. Di solito questa condizione patologica si attenua fino spesso a scomparire con gli anni.

### ■ Eosinofilia

Si parla di eosinofilia quando la concentrazione degli eosinofili nel sangue periferico supera il numero di  $0,4 \times 10^9/L$ . Le cause responsabili di eosinofilia sono numerose (Tab. 60.9) ma nella pratica clinica talora riesce molto difficile individuare i fenomeni che sono alla base dell'aumento degli eosinofili. Nella sindrome ipereosinofila, che è criptogenetica, si manifesta, oltre ad una marcata e persistente eosinofilia ( $>1,5 \times 10^9/l$ ), infiltrazione di eosinofili, in particolare nella cute, nei tessuti dell'apparato respiratorio e nelle valvole cardiache. Nei rari pazienti con tale sindrome si è dimostrata efficace la terapia con farmaci citostatici o con corti-

**Tab. 60.9** Principali cause di eosinofilia.

- 
- Allergie di vario tipo
  - Ipersensibilità a farmaci
  - Infestioni da parassiti
  - Processi di guarigione di malattie infettive acute
  - Alcune patologie dermatologiche (ad es. psoriasi e pemfigo)
  - Poliarterite nodosa
  - Morbo di Hodgkin
  - Tumori maligni (occasionalmente)
  - Terapia con fattori di crescita emopoietici, in particolare GCSF
  - Leucemia eosinofila (molto rara)
  - Aumentata sintesi di alcune citochine (ad es. IL-5 da parte dei linfociti T CD4<sup>+</sup>)
- 

sonici. L'interleuchina 5 (IL-5) è il fattore di crescita emopoietico che stimola la produzione di eosinofili.

Non sono note cause di eosinofilia.

### ■ Basofilia

L'aumento del numero dei basofili al di sopra di  $0,1 \times 10^9$  è molto raro. Esso si associa di solito ad alcune malattie mieloproliferative ed alla leucemia mieloide cronica.

La riduzione del numero dei basofili è di impossibile riscontro dato il valore molto basso della concentrazione di essi nel sangue periferico in condizioni fisiologiche.

### ■ Monocitosi

Anche la monocitosi con aumento di tali elementi al di sopra di  $0,8 \times 10^9$  è di riscontro molto raro. Tuttavia monocitosi di discreta entità possono fare la loro comparsa nel corso di alcune malattie infettive croniche (tubercolosi, brucellosi, salmonellosi), nelle infezioni da protozoi, nel morbo di Hodgkin, nelle sindromi mielodisplastiche ed anche nel corso del trattamento con fattori di crescita emopoietici, quali il GM-CSF o l'M-CSF.

## 60.7 Anomalie strutturali dei neutrofili

- a) **Ipersegmentazione del nucleo.** Un aumento del numero dei neutrofili con nucleo ipersegmentato (5 o più lobi) è caratteristico dell'anemia megaloblastica ma può essere ereditato come carattere autosomico dominante, e si accompagna a cellule con dimensioni doppie della norma ma con funzioni normali.
- b) **Iposegmentazione del nucleo.** Si ritrova nell'*anomia di Pelger-Huet*, che si eredita come carattere dominante, ma può essere acquisita in alcuni disordini ematologici, come la leucemia, o in alcune forme infettive. Il nucleo è rotondeggiante, ma questo non si accompagna a modificazioni funzionali.
- c) **Presenza dei corpi di Dohle.** Si tratta di formazioni citoplasmatiche piccole, blu lucenti, di forma ovale, presenti nei neutrofili di pazienti con gravi infezioni, tumori, o dopo somministrazione di farmaci citotossici. Sono anche caratteristici di una forma ereditaria, l'*anomia di May-Hegglin*, associata a neutropenia e presenza di piastrine giganti.
- d) **Corpi di Auer.** Sono inclusioni a bacchetta, rosso bluastre, che si ritrovano nel citoplasma di mieloblasti e promielociti in alcuni casi di leucemia acuta mieloide. Si originano da una non meglio definita anomalia nella formazione dei granuli e rappresentano pertanto lisosomi abnormi.

### 60.8 Disordini della funzione dei granulociti

Si manifestano in diverse malattie ereditarie che sono state descritte nel capitolo sulle Immunodeficienze al quale si rimanda.

### 60.9 Trombocitemia essenziale e trombocitopenia

La *trombocitemia* essenziale è una rara malattia clonale, che comporta un'esagerata proliferazione midollare della linea megacariocitica che si riflette in una iperproduzione di piastrine, la cui concentrazione nel sangue risulta in maniera duratura superiore a 600.000/ $\mu$ l. I pazienti, che sono nella quasi totalità asintomatici, tanto che la malattia viene scoperta in occasione di routinarie indagini di laboratorio, sono esposti ad un aumentato rischio di fenomeni trombotici o emorragici. In alcuni di essi la sintomatologia si manifesta con eritromelalgia, cioè con una sensazione di bruciore alle dita e con splenomegalia. La malattia, che si sviluppa generalmente in soggetti di età superiore a 50 anni, non incide né sulla conduzione di una vita normale né sulla loro sopravvivenza. La terapia con idrossiurea risulta valida a mantenere la concentrazione ematica delle piastrine al di sotto di 600.000/ml.

In circa la metà dei pazienti affetti da trombocitemia essenziale è presente nei progenitori dei megacariociti una mutazione attivante somatica del gene JACK-2, che codifica per una tirosinchinasi coinvolta nella trasduzione del segnale di ricettori transmembranaei. Questa scoperta ha permesso di ritenere che la patogenesi della malattia sia dovuta ad una esagerata trasmissione di segnali proliferativi nei precursori dei megacariociti, che comporta un'eccessiva formazione di queste cellule e, quindi, delle piastrine, derivate dalla loro frammentazione.

La condizione opposta alla trombocitemia, definita *trombocitopenia*, determina una riduzione nel sangue

del numero delle piastrine fino anche a poche migliaia/ml, non associata ad anemia ed a granulocitopenia ed una sintomatologia consistente nella comparsa di porpora cutanea, di emorragie mucosali e di prolungato sanguinamento posttraumatico.

Le rare forme congenite di trombocitopenia sono dovute:

- a) a difetti genetici del gene che codifica per il recettore della trombopoietina, che è il più importante regolatore della megacariocitopoiesi;
- 2) alla sindrome di Wiskott-Aldrich, trasmessa con meccanismo autosomico recessivo, causata da mutazioni del gene was, espresso nei progenitori emopoietici che codifica per una proteina citoscheletrica. È caratterizzata, oltre che da piastrinopenia e da anemia emolitica, da grave insufficienza immunitaria;
- 3) alla sindrome di May-Hegglin, causata da mutazioni del gene MYH9, mappato nel cromosoma 22q 12-13, trasmessa con meccanismo autosomico dominante e caratterizzata dalla presenza nel sangue di piastrine giganti e poco funzionanti, che possono diventare responsabili della comparsa di fenomeni emorragici.

Le forme acquisite, che sono di gran lunga le più frequenti, si manifestano essenzialmente in concomitanza di:

- 1) depressione midollare iatrogena (da chemio- o radioterapia, da uso prolungato di alcuni antibiotici, in particolare del cloramfenicolo, o secondaria a patologie ematologiche o a varie intossicazioni);
- 2) aumentata distruzione di piastrine (da patologie autoimmunitarie, tra cui una piastrinopenia autoimmune o conseguente ad alcuni processi infettivi, quali ad es l'AIDS);
- 3) splenomegalia con sequestro di piastrine nella milza.

### Bibliografia essenziale e letture consigliate

Castoldi G., Liso V. *Malattie del sangue e degli organi emopoietici* (III ed.), McGraw Hill, 2003.

Hoffbard A.V., Petit J.V., Moss P.A.H. *Essential Hematology* (IV ed.), 2001

Tura S. *Lezioni di Ematologia* (VI ed). Società editrice Esculapio, 2003.