

PATOLOGIA CLINICA
Anno scolastico 2019-2020
Prof.ssa Maria Franzini

9 Aprile 2019

Non tutte le anemie microcitarie dipendono da carenza di ferro, possiamo avere anche nel metabolismo una disponibilità assolutamente normale di ferro e allora bisogna trovare una spiegazione alternativa, che possa spiegare la microcitosi.

Allora si ha aspetti genetici relativi all'EMOGLOBINOPATIE cioè disordini qualitativi e o qualitativi della sintesi causate da mutazioni genetiche.

Per capire se sono di fronte ad una emoglobinopatia, devo trovare un modo di studiare l'Hb.

Si parte con un piccolo es che riguarda il disordine, cioè alterazione quantitativa della sintesi dell'Hb e questo sono malattie che si chiamano TALASSEMIE che sono varianti strutturali dell'Hb.

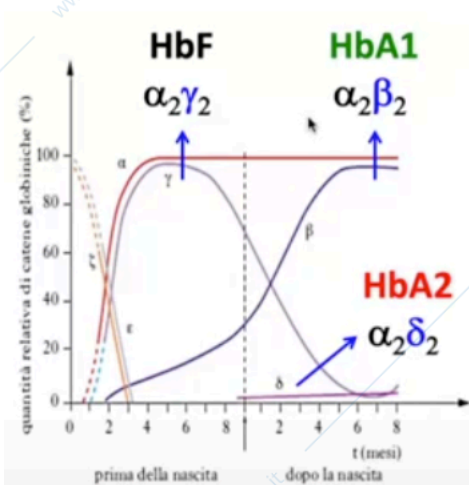
Prima di arrivare alla talassemia si va a vedere come è costituita l'Hb.

STRUTTURA DELL'EMOGLOBINA

L'emoglobina è un dimero costituita da 2 catene alfa e 2 beta nel tetramero e ogni globina porta un gruppo eme e quindi possono legare un atomo di ossigeno.

Questo è la conformazione dell'adulto, l'emoglobina nel corso dello sviluppo dell'individuo subisce una serie di variazioni, nella vita fetale, sostanzialmente viene sintetizzata quasi da subito, per la catena beta esiste un'evoluzione di catene simil beta che vanno sostituendosi dalla vita embrionale alla vita fetale e quindi nell'adulto.

Entità % della sintesi delle catene emoglobiniche nel corso della gravidanza e del primo anno di vita



Presenza % delle diverse emoglobine nei soggetti normali	
HbA adulto	95 – 98 %
HbA2 adulto	2 – 3 %
HbF adulto	0.8 – 2 %
HbF neonato	50 – 80 %
HbF 6 mesi	< 2 – 8 %
HbF > 6 mesi	1 – 2 %

In questo schema si può vedere che nel periodo prenatale la catena alfa inizia a essere sintetizzata e poi permane vita naturale durante, mentre nella catena beta presente nell'adulto viene sintetizzata verso la fine della gestazione e poi aumenta la sua produzione dopo la nascita. Nella vita prenatale è

sostituita dalla gamma. Quindi nel feto l'emoglobina è costituita da 2 catene alfa e due catene gamma. E questo è l'HbF. Nell'adulto la catena gamma è sostituita nei primi 6 mesi di vita dalla catena beta quindi l'emoglobina sarà il tetramero alfa₂ beta₂. Dopo la nascita si ha una sintesi quantitativamente minima di catena delta, per cui nell'adulto si può anche riscontrare l'HbA₂ che è costituita da due catene alfa e due delta. Quindi nell'adulto si trova sostanzialmente 3 forme di Hb: A 95%, A₂ 2%, HbF quasi non rilevabile. HbF predomina nella vita fetale e nel neonato, tanto che il sangue cordonale è costituito per il 70-80% di HbF e restante A, e A₂ assente.

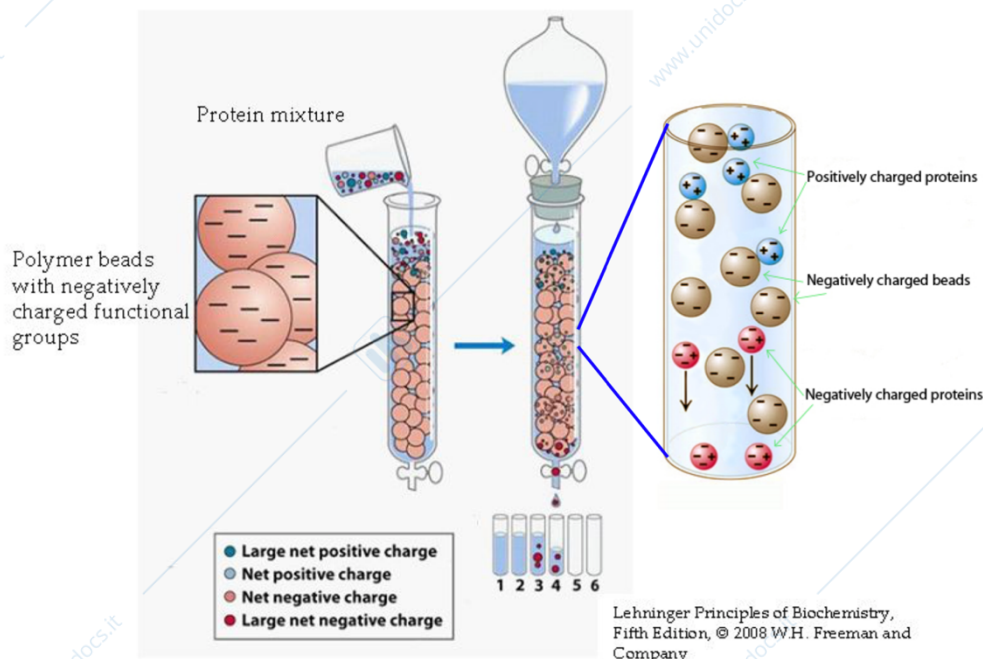
RIASSUNTO

Quando non è anemia sideropenica, può essere una emoglobinopatia, cioè disordini qualitativi o quantitativi della sintesi emoglobinica causata da mutazioni genetiche. L'emoglobina nel feto è costituita da HbF, nei primi 6 mesi HbF viene sostituita da HbA. Si arriva all'adulto che ha 3 forme diverse di Hb con prevalenza del HbA 90%, a seguire HbA₂ (3%) e infine anche HbF (<2%).

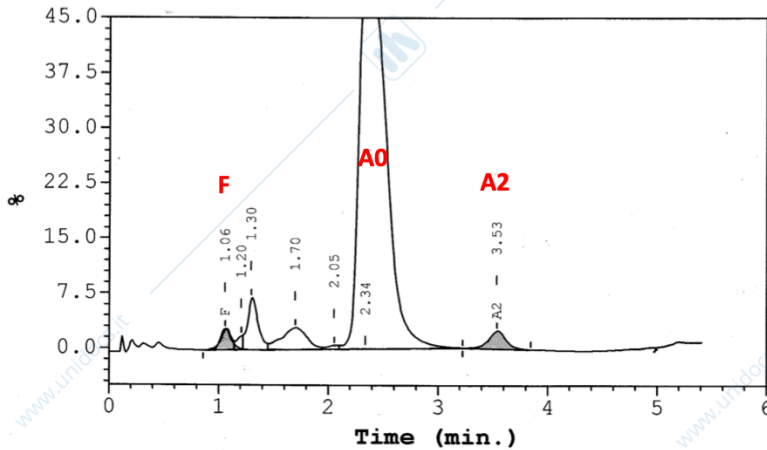
STUDIARE ASSETTO EMOGLOBINICO

Ci sono diversi metodi di separazione che ci permettono di studiare l'assetto emoglobinico che si basano sostanzialmente sulla separazione delle diverse forme di Hb in base alla carica totale della molecola, per cui a lungo si sono usate tecniche ELETTROFORETICHE, ora si usano prevalentemente come riconferma o come approfondimento e mentre la tecnica di primo livello per lo studio di queste forme emoglobiniche al momento è una CROMATOGRAFIA che è sostanzialmente una tecnica di separazione che avviene fisicamente attraverso una colonna con un pallone sopra con sistema di pompe automatizzato. La colonna ha una fase interna che permette di separare le forme di Hb, in base alla loro carica e nel particolare è una cromatografia, quindi una fase stazionaria negativa per cui seleziona e separa in base all'entità e positività dell'Hb.

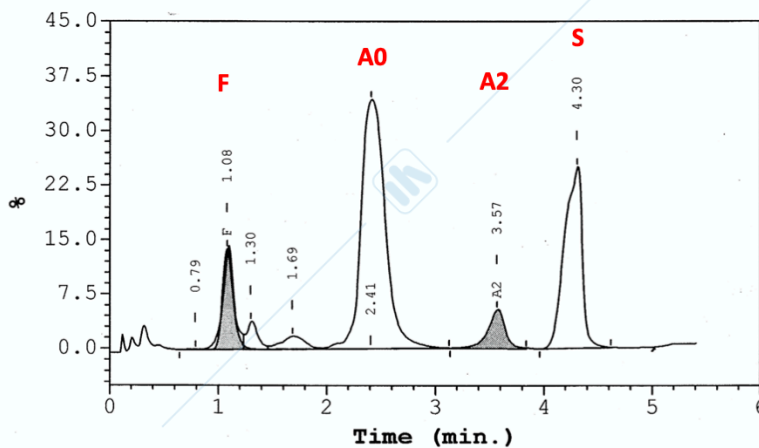
CROMATOGRAFIA A SCAMBIO CATIONICO



Il succo di tutto questo è che forme di Hb escono dalla colonna in tempi diversi, quindi esce per prima F, A e infine A2, quindi la colonna serve a separare le molecole, e all'uscita della colonna si ha sistema di regolazione spettrofotometrico che permettono di leggere mano mano che passa Hb.



Questo fa sì che si ottiene un grafico che si chiama cromatogramma e l'area sottesa al picco, quindi incluso tra il picco e la linea di base rappresenta la quantità di Hb associata ad ogni forma, questi picchi in più sono forme di degradazione di HbA (non ci interessano). La tecnica cromatografica ci permette di separare le forme emoglobiniche sia normali che varianti e ci permettono di quantificarle, la quantificazione si esprime come % della quantità totale di Hb presente nel campione.



segna un'altra variante emoglobinica, quindi un Hb che contiene una delle catene, alfa o beta mutata.

Es. quarto picco HbS dell'anemia falciforme.

Ci sono condizioni in cui fare questo studio ci aiuta a definire il caso. In particolare parlando di talassemie, si è parlato di difetti quantitativi delle forme emoglobiniche.

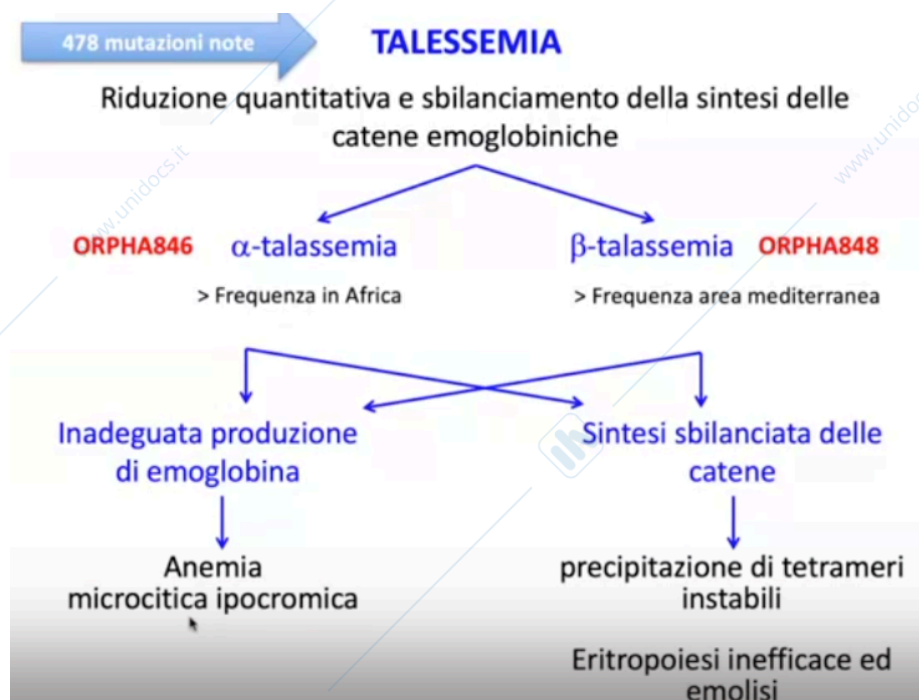
RIASSUNTO

Al momento il metodo di separazione più usato per lo studio delle emoglobine è la cromatografia, è una tecnica che separa le emoglobine in base alla loro carica elettrica, queste Hb escono in tempi diversi e attraversano un sistema di regolazione spettrofotometrico, da tutto ciò si ottiene un cromatogramma, un grafico con dentro vari picchi che rappresentano le diverse tipologie di Hb. Ci permette di vedere se sono presenti solo le tre forme dell'adulto (A, A2, F) oppure ha un quarto picco che rappresenta l'Hb patologico.

TALASSEMIA

La talassemia è un insieme di malattie accomunate tutte da un difetto quantitativo di sintesi genetiche e possono interessare queste mutazioni che riducono la quantità di sintesi, sia globuline alfa che beta.

Anche per la talassemia sono note quasi 500 mutazioni diverse che possono indurre talassemia. Quindi la riduzione della sintesi interesserà o la globulina alfa o globulina beta, quindi saremmo di fronte o ad una alfa talassemia o ad una beta talassemia, quindi questo vuol dire che se sono in un caso di alfa talassemia allora la globina alfa sarà quantitativamente ridotta e la globina beta sarà sintetizzata normalmente, invece inversa nella beta talassemia, dove le catene beta saranno ridotte e alfa normali. Quindi succede che aldilà che la genesi sia diversa, eziologia diverse perché sono patologie diverse, alcuni elementi della manifestazione si sovrappongono e sono determinate da una parte da una ridotta produzione di Hb, quindi si ha una carenza di alfa e una carenza di beta, nel complesso farà meno emoglobina A che ricorda essere il tetramero $\alpha_2\beta_2$ quindi vado incontro ad anemia microcitica ipocromica. Microcitica perché contengono meno Hb che viene sintetizzata in quantità ridotta e contenendo meno Hb, i Gr sono ipocromici. La riduzione della disponibilità di Hb è uno dei meccanismi patogenetici, un altro elemento che si sovrappone alla patogenesi della talassemia è l'effetto dello sbilanciamento delle catene, quindi se sono in una condizione di beta talassemia, quindi ho ridotta quantità di catena beta e ho un eccesso di catena alfa che tenderanno a formare degli omotetrameri che però sono instabili e tendono quindi a precipitare e rompere il GR, la stessa cosa succede con l'alfa talassemia, una riduzione di catene alfa, le beta globuline tenderanno ad aggregare e i tetrameri beta a precipitare e favorire la rottura. Quindi l'anemia è aggravata da un aumentata emolisi del GR.



Inoltre anche quando si formano questi ppt che si possono formare anche durante la maturazione degli eritrociti, vanno ad alterare anche l'eritropoiesi stesso, quindi aggravando ulteriormente la presentazione dell'anemia, quindi questi sono i due cardini della patogenesi della talassemia: inadeguata disponibilità di Hb A e precipitazione delle globuline che rimangono in eccesso.

RIASSUNTO

La talassemia è l'insieme delle malattie con un difetto quantitativo di sintesi emoglobinica, causate da mutazioni genetiche. Si distingue in alfa talassemia e beta talassemia che sono l'una l'inversa dell'altra. Nell' α talassemia si ha ridotta sintesi di globuline α e normale di β , inversa nella β talassemia. Quindi nel complesso si ha: riduzione dell'HbA, sbilanciamento delle catene con formazione di omotetrameri instabili quindi tendono a precipitare e causare emolisi del GR, inoltre questi ppt alterano anche l'eritropoiesi stesso.

DIFFUSIONE DELLA BETA TALASSEMIA IN ITALIA

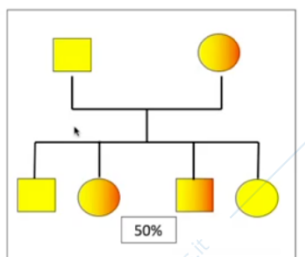
La beta talassemia è diffusa nell'area mediterranea, incluso in Italia, per cui ci sono zone endemiche, conosciuta come anemia mediterranea. È una condizione piuttosto diffusa, per lo meno in forma eterozigote.

BETA TALASSEMIA

Si parla prevalentemente di beta talassemia, per la alfa talassemia tante cose si sovrappongono. Quindi se capiamo una si capisce anche l'altra.

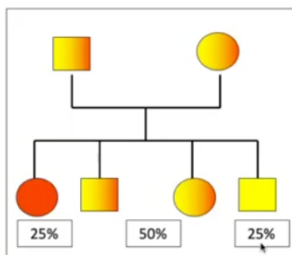
Noi abbiamo due geni per la beta globina, 1 di origine materna e 1 paterna. La trasmissione nella beta talassemia è una trasmissione autosomica recessiva, appunto il gene si trova sul cromosoma 11 che è autosomico.

In questo schema, si ha un genitore portatore e uno sano: si ha la possibilità il 50% di figli portatori di beta talassemia, quindi figli eterozigoti per un gene beta mutato.



Talassemia Minor (tratto talassemico)
 β^0/β
 β^+/β

In rosso è riportato il gene mutato, con diverse nomenclature: beta + e beta0, questo vuol dire che delle 400 mutazioni note, si associano ad espressioni diverse, per cui ci sono mutazioni che silenziano completamente il gene beta e sono quelle denominate da 0, quindi quando siamo di fronte alla beta 0 non ho assolutamente produzione di catene beta, mentre se sono di fronte a mutazioni beta+ posso avere una produzione di catene beta, in quantità molto variabili, questo complica le cose, perché aumenta la presentazione fenotipica, se si ha talassemia minor. Questo è meno importante perché comunque il 50% dell'emoglobina beta permette una vita normale, quindi senza sintomatologia.



Talassemia Major/intermedia
 β^0/β^0 (morbo di Cooley) HbA1=0
 β^+/β^+ HbA1 molto ridotta
 β^0/β^+

Se invece siamo nel caso di due genitori, entrambi eterozigoti, portatori di una mutazione beta avremo il 25% dei figli sani, 50% eterozigoti e il restante 25% con entrambi i geni mutati, siamo di fronte allora ad una talassemia major, quindi una talassemia omozigotica secondo la tipologia di mutazione potrà avere un fenotipo molto grave.

Diventa più determinante quando sono in una situazione di omozigote, perché posso avere un fenotipo molto diverso, più grave che si associa ad una completa assenza di globina beta (morbo di cooley) non ho assolutamente globina A, a manifestazioni tipiche intermedie che dipendono dalla tipologia di mutazioni: Potrei avere mutazioni che silenziano completamente il gene beta e avere solo il 50% della beta ma mutata o avere un mix di mutazioni. Ha ampia variazione di espressione.

RIASSUNTO

Nella beta talassemia si ha due geni per la beta globina (1 paterna, 1 materna) che si trovano sul cromosoma 11 (autosomico), è una malattia autosomica recessiva. Si può avere due casi: il primo con un genitore portatore e uno sano si ha il 50% di avere figli portatori. Si hanno mutazioni che silenziano completamente o parzialmente il gene beta, comunque non da gravi problemi in quando si ha sempre l'altro gene beta che è normale, il quale permette una vita normale. Nel secondo caso si ha entrambi i genitori portatori, si ha 50% di probabilità che il figlio sia portatore e 25% che abbia la talassemia major, si può avere tre diversi casi che sono la completa assenza di globina beta (letale) e manifestazioni intermedie.

TALASSEMIA MINOR (più frequente)

Dal punto di vista CLINICO sostanzialmente la situazione di eterozigosi non ha segni clinici evidenti, per cui il soggetto fin tanto che già per conoscenza del tratto in famiglia, altrimenti non si accorge neanche di essere portatore di mutazione sul gene beta. Non c'è sintomatologia, al massimo c'è qualche segno laboratoristico.

APPROCCIO DIAGNOSTICO ALLA β -TALASSEMIA MINOR

LABORATORIO

Parametro		
Hb totale	↓ < 20% o al limite inf.	Anemia
MCV	↓ < 78 fL (62-75)	Microcitosi
RDW	↑	Anisocitosi (++)
MCH	↓ < 27 pg (19-23)	Ipocromia
MCHC	=↓ < o normale	
RETICULOCITI e RBC	↑ ↑ 5-7 10 ⁶ /μL	Eritrocitosi compensatoria

Quindi se il soggetto si fa un emocromo, potrà trovare una Hb un po' ridotta (anemia), un indice corpuscolare medio leggermente ridotto (MCV), un aumentata anisocitosi, diminuito contenuto di Hb per GR (MCH), però un aumento sia di reticulociti che di GR. quindi al soggetto che sta bene l'emocromo da comunque segni di una anemia microcitica ipocromica con aumentata anisocitosi e quindi questo ci segnala un problema al livello dell'eritropoiesi.

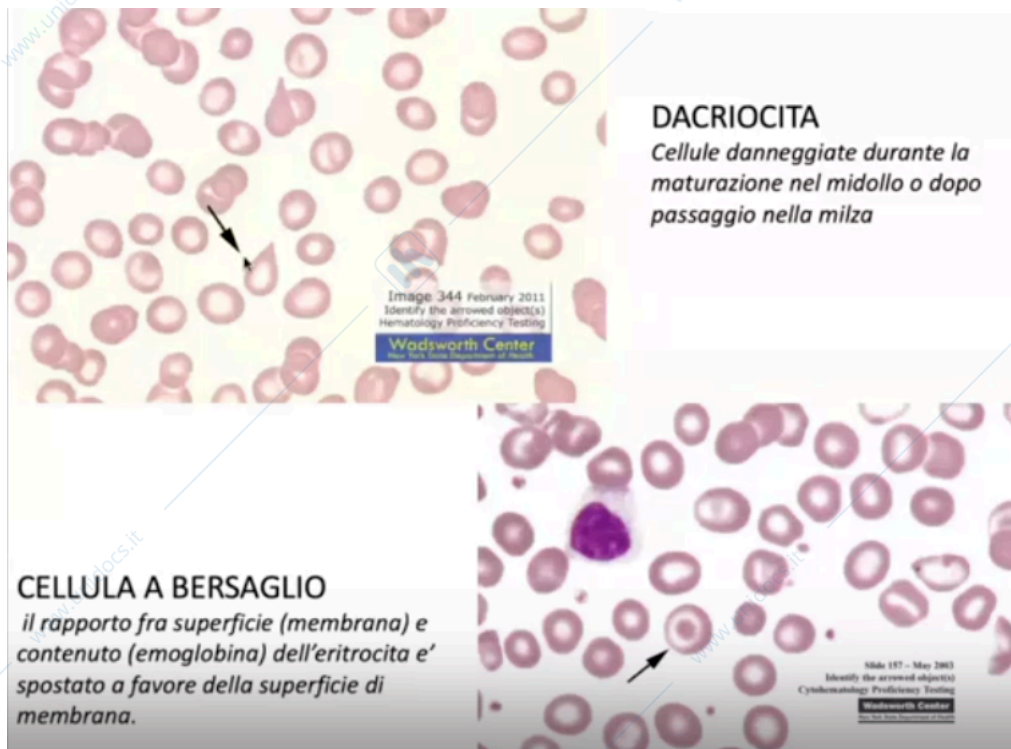
Ci sono più reticulociti e GR nel circolo con l'idea di mettere più Hb in circolo, quindi i sensori al livello periferico che al livello renale, registrano comunque la tendenza all'ipossia tessutale e quindi si risponde cercando di stimolare il midollo, aumentando il numero dei GR. tuttavia se aumento il numero la capacità di produzione di Hb rimangono comunque limitate.



- Freccia nera: RBC ipocromico, microcitico
- Freccia blu: RBC macrocitico
- osservare la variabilità delle dimensioni dei RBC (elevata anisocitosi ++ RDW)

Se facessimo uno striscio potremo vedere:

- ipocromia
- anisocitosi



DACRIOCIITA: GR a goccia, data da maturazione difficoltosa da eritropoiesi inefficace, quindi si hanno delle alterazioni nella forma, della fragilità del GR, che possono essere deformati in maniera irreversibile nel passaggio nella milza.

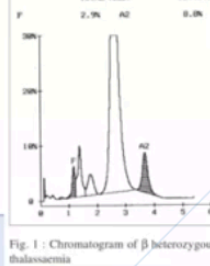
CELLULA BERSAGLIO: sembra un bersaglio, è una conseguenza di una variazione della superficie del GR e il contenuto di Hb, quindi alla fine questo suo aspetto sono delle alterazioni della forma, della struttura del GR che tende a inspessirsi al centro e lo vediamo più rosso. Anche questa è una conseguenza della ridotta quantità di Hb presente nel GR.

APPROCCIO DIAGNOSTICO ALLA β -TALASSEMIA MINOR

LABORATORIO

Eritrocitosi
Anemia moderata - ipocromia
Microcitosi
Anisocitosi

TECH ID#	0		
SAMPLE ID#	42		
ANALYTE ID#	%	TIME	AREA
F1	8.2	8.72	2768
F2	2.9	1.18	9596
F3	7.2	1.27	2640
F4	4.4	2.75	14818
A1	95.2	2.59	95129
A2	8.8	3.67	9796
TOTAL AREA			1244549
F	2.9%	A2	0.8%



EMOGLOBINE			
HbA1 (α_2/β_2)	↓	(rif. 95-98%)	ATTENZIONE: in carenza di Fe i valori di HbA2 possono diminuire → falso neg.
HbA2 (α_2/δ_2)	↑	3.5 – 7.0% (rif. 2-3%)	
HbF (α_2/γ_2)	↑	1.0 – 3.0% (rif. 0.8-2%)	

L'altro segno di laboratorio tipico della beta talassemia minor, oltre a quelli dell'emocromo, quindi dell'anemia microcitica ipocromica, ci fornisce un ulteriore segno, lo studio dell'**ASSETTO EMOGLOBINICO** perché l'assetto emoglobinico non si altera in qualità e in tipologia di emoglobine, ma si altera in quantità. In particolare HbA tende a ridursi perché in questo caso si ha minore disponibilità di globuline beta e si istaura un meccanismo compensatorio per cercare di mantenere la quantità di emoglobina

disponibile che agisce prevalentemente su HbA2 che può salire fino al 7%, si può osservare ma non sempre un leggero incremento dell'HbF entro il 3% circa. L'aumento della A2 è un segno, un momento caratteristico del tratto talassemico, mentre l'aumento dell'emoglobina F può anche non esserci.

Quindi quando noi studiamo l'assetto emoglobinico e troviamo un aumento di HbA2 si associa ad un emocromo che mi propone un'anemia microcitica e ipocromica, allora posso

ragionevolmente commentare di essere di fronte ad un tratto talassemico beta. Si consiglia comunque l'analisi genetica a conferma. Quindi l'insieme dei dati dell'emocromo e dei dati dell'assetto emoglobinico, ci possono far porre il sospetto di tratto talassemico, ma non ci può dare una conferma, che si può fare solo andando ad individuare una mutazione nel gene beta che si associa ad una sua ridotta espressione.

Questi segni che abbiamo discusso ora sono segni di laboratorio, sono alterazioni di alcuni biomarcatori, però il quadro è silente, asintomatico. Allora perché abbiamo aumentato il lavoro per identificare i potenziali tratti talassemici?

Il significato è quello di effettuare uno screening da associare ad una consulenza genetica, il lavoro è aumentato perché da quasi un anno in toscana lo studio dell'assetto emoglobinico è stato aggiunto all'analisi della gravidanza che si fanno nel primo semestre, quindi dall'accettazione noi sappiamo che stiamo valutando un prelievo di una donna incinta, se individuiamo un tratto talassemico consigliamo uno studio dell'assetto emoglobinico anche al partner, al di là dell'approfondire l'aspetto genetico per individuare il possibile esito. Quindi se avrò un partner normale il rischio è solo di avere figli portatori, non c'è il rischio per la salute, se invece se siamo di fronte ad una coppia entrambi portatori, devo allora valutare la possibilità di una talassemia major. E proprio per il fatto che i portatori sono silenti, non hanno manifestazione, ma il nascituro può essere affetto da una malattia molto grave, ha fatto ritenere che è importante lo screening dello studio associato alla osservazione dell'emocromo.

RIASSUNTO

- La talassemia minor è asintomatico, sono presenti solo segni di laboratorio dove si ha anemia microcitica ipocromica anisocitosi con eritrocitosi e aumento di reticolociti (meccanismo compensatorio inutile).
- Un altro segno di laboratorio è dato dall'assetto emoglobinico dove si ha alterazione di quantità: la ridotta quantità di HbA induce una maggior sintesi di HbA2 sostanzialmente e in alcuni casi anche un leggero aumento di HbF (meccanismo compensatorio).
- Al microscopio si possono osservare i dacriociti che sono GR a forma di goccia deformati in maniera irreversibile durante il passaggio nella milza, le cellule al bersaglio dove si ha riduzione di Hb e variazione di forma con centro inspessito.
- Viene fatto uno screen associato ad una consulenza genetica su donne incinta, se portatori anche il loro partner per evitare la possibilità di una talassemia major nel nuovo nascituro (grave).

TALASSEMIA MAJOR

La CLINICA nella talassemia major è una clinica importante, dove i segni e i sintomi ci sono e possono essere molto gravi, l'anemia è grave, importante ed ha un esordio molto precoce, nel momento soprattutto la quale ho un alternanza, scambio tra catena gamma e beta che non potrà essere prodotta, perché comunque il silenziamento della catena gamma è indipendente dalla produzione di catene beta, quindi si va incontro subito alla necessità di trasfusione.

Un altro segno è l'epato-spleno-megalia per ipertrofia di questi tessuto, che è un eccesso funzionale, perché appunto vengono messi in circolo i GR danneggiati che verranno rimossi dalla milza, quindi l'alterazione della struttura, forma del GR rende il GR più fragile, dipende da un'eritropoiesi inefficace data da mancata produzione di Hb.

Poi nel tentativo di compensazione verrà messo in atto in condizione di eterozigote, anche qui si cerca di aumentare, di far lavorare di più l'eritropoiesi e avere più GR in circolo e tentare di compensare l'ipossia e questo comporta l'iperplasia, ipertrofia del tessuto ematopoietico che porterà alla deformazione sia delle ossa e si riavrà l'attivazione dei siti di emopoiesi extramidollare.

RIASSUNTO

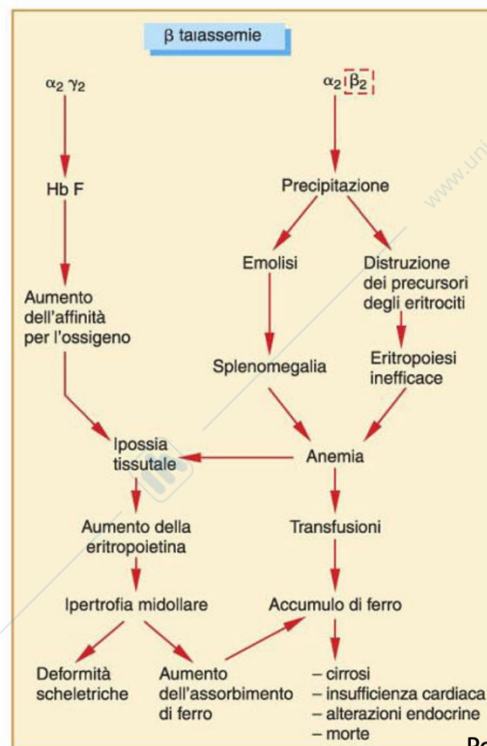
APPROCCIO DIAGNOSTICO ALLA β -TALASSEMIA MAJOR

CLINICA

β^0/β^0 ; segni e sintomi severi;

- ✓ Anemia severa: esordio 6-24 mesi (switch γ/β) → trasfusioni
- ✓ Epato-spleno-megalia: eccesso funzionale (rimozione RBC emolizzati)
- ✓ Emopoiesi extra-midollare (deformazioni ossee, fragilità) – tentativo di compensazione

β -TALASSEMIA MAJOR: β^0/β^0 ; segni e sintomi severi;



- ✓ Anemia severa: esordio 6-24 mesi (switch γ/β) → trasfusioni

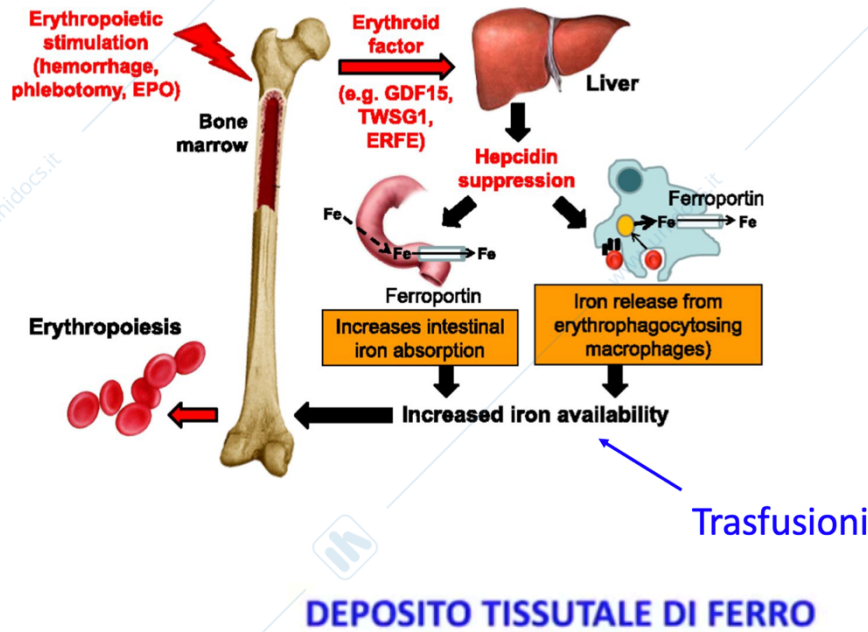
- ✓ Epato-spleno-megalia: eccesso funzionale (rimozione RBC emolizzati)

- ✓ Emopoiesi extra-midollare (deformazioni ossee, fragilità) – tentativo di compensazione

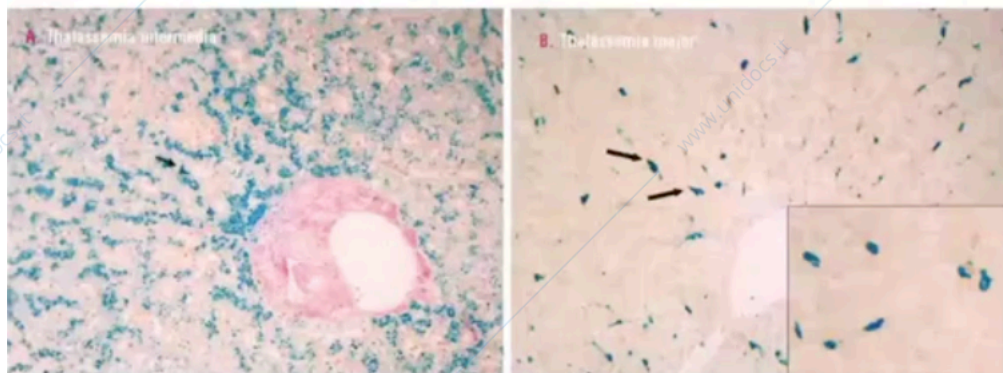
Pontieri. Patologia Generale

Nell'adulto l'emopoiesi è legata alle ossa piatte, ma nel feto anche il fegato e la milza sono dei siti di eritropoiesi che possono cercare di essere recuperati nel tentativo di compensazione dell'aumento della produzione di GR.

- ✓ Accumulo di Ferro (emolisi + apporto trasfusionale + assorbimento alimentare eccessivo – bassi livelli di epcidina)



Altro elemento che possono aggravare la malattia, questa è una condizione che ha bisogno di una continua trasfusione, questo comporta un eccesso di ferro che potrà andarsi ad accumulare nei vari tessuti, ad es nel fegato che anche questo comporterà danni tissutali e delle disfunzioni di organo.



Iron distribution in the liver of thalassemia intermedia (A) and major (B) patients.
A. Stored iron is found mainly at the biliary pole of hepatocytes. Only sporadic iron-loaded hypertrophic Kupffer cells are observed (arrow) (Perls' stain, original magnification is x250).
B. Stored iron is observed mainly in hypertrophic Kupffer cells (arrows) (Perls' stain, original magnification is x250). At higher magnification (x400, insert), fine hemosiderin granules are also seen in the cytoplasm of hepatocytes.

La colorazione del ferro, si vede questo tessuto epatico, il ferro è sostanzialmente è captato nei sinusoidi nelle cellule di Kupffer che sono macrofagi del fegato. I macrofagi dei tessuti reticolo endoteliale è il principale sito di raccolta del ferro, nella ferritina. C'è questo accumulo eccessivo che comporta un aumento dello stress ossidativo, una condizione di

infiammazione cronica con conseguenti danni al tessuto e l'accumulo può essere tale da indurre la precipitazione di questi granuli che si chiamano EMOSIDERINA che sono depositi insolubili che non possono essere più rimossi dalla cellula e quindi andranno ad alterare il normale metabolismo della cellula con conseguente promozione di senescenza, necrosi e apoptosi della cellula.

RIASSUNTO

Nel momento in cui si ha la sostituzione della globulina γ con la β nei 6 mesi di vita, è una fase cruciale, si necessita di trasfusioni continue che causano un eccesso di ferro in vari tessuti come ferritina, ad es nel fegato nelle cellule di Kupffer nel reticolo endoteliale. Questo accumulo comporta uno stress ossidativo, infiammazione cronica dove ferritina diventa emosiderina e precipita alterando il normale metabolismo con conseguenze promozione alla senescenza, necrosi, apoptosi.

APPROCCIO DIAGNOSTICO ALLA β -TALASSEMIA MAJOR

LABORATORIO

Parametro		
Hb totale	↓ 2 – 5 g/dL	Anemia
MCV	↓ 55 – 70 fL	Microcitosi
RDW	↑ 19 – 20 %	Anisocitosi (++)
MCH	↓↓	Ipocromia
MCHC	↓	

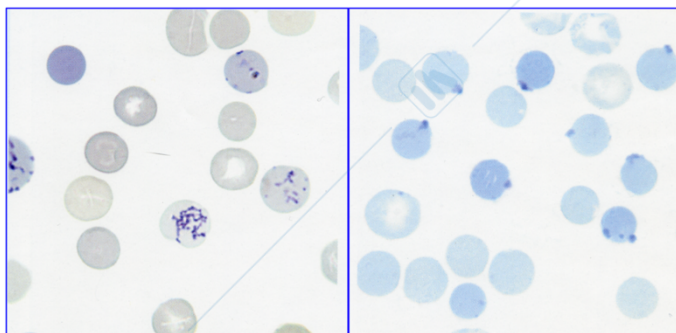
Dal punto di vista del laboratorio si propone in maniera più accentuata, si ha anemia molto più importante, Gr molto piccoli, anisocitosi marcata, ipocromia.

In più dallo striscio si osservano gli ERITROBLASTI che sono precursori dei GR, dimostra come è difficoltà la eritropoiesi.

Poi ci sono altre modificazioni che si possono essere osservare, possono rimanere GR con frammenti di nucleo oppure anche nei GR si osservano dei puntini che sono dei granuli di depositi di ferro, ma più vicino a quello che abbiamo discusso all'inizio della lezione sono i ppt di Hb, quindi se siamo nel caso di beta talassemia, i ppt sono di emoglobina alfa quindi della globina prodotta in eccesso.

Heinz bodies – precipitated hemoglobin

appear as small round inclusions within the red cell body, though they are not visible when stained with Wright-Giemsa dyes. They appear more clearly when supravivally stained (e.g., with new methylene blue or bromocresol green).



reticolociti

Corpi di Heinz

CORPI DI HEINZ, la colorazione di destra colora esclusivamente la proteina, si mette in evidenza questo punto di deformazione, come colorazione di blu più intenso che corrisponde al ppt costituito da catena alfa, che si deposita sulla membrana e lo deforma, lo può anche rompere la membrana meccanicamente provocando un emolisi. Accanto la colorazione dei RETICOCITI, si utilizza gli stessi coloranti, poi l'aspetto è molto diverso, perché si forma ppt di acido ribonucleici,

mentre i ppt di Hb si chiamano corpi di Heinz, si vedono questo singolo, 2 o 3 numero discreto depositato sulla membrana che deforma il GR.

Per quanto riguarda il nostro studio nell'assetto emoglobinico, sostanzialmente non avremo HbA perché non si ha catene beta, il tentativo di compensazione dell'A2 c'è ma rimane comunque limitato perché la sua capacità espressiva è limitata, si ha incremento, ma non sostituzione. Nella talassemia Major rimane l'espressione dell'HbF che può essere importante fino a 70-80%. Ho un'elevata produzione di emoglobina, HbF non mitiga, non compensa la mancanza di HbA perché troppa affinità per l'ossigeno quindi la cede con difficoltà con i tessuti, quindi non è un trasportatore idoneo di ossigeno nei tessuti, quindi non riesce a vicariare la funzione dell'HbA e quindi non risolve la situazione. È una malattia molto importante, grave, che si controlla con tante trasfusioni, che poi hanno importanti effetti collaterali come l'accumulo di ferro oppure bisogna arrivare ad un trapianto di midollo, è importante poter screenare i futuri genitori, l'analisi cromatografica è un'analisi semplice di basso costo, quindi ne vale la pena.

APPROCCIO DIAGNOSTICO ALLA β -TALASSEMIA MAJOR

LABORATORIO

Marcata
Anemia - ipocromia
Microcitosi
Anisocitosi
Poichilocitosi

EMOGLOBINE			
HbA1 (α_2/β_2)	↓	≈ 0%	(rif. 95-98%)
HbA2 (α_2/δ_2)	↑	≈ 5%	(rif. 2-3%)
HbF (α_2/γ_2)	(↑)	> 95%	(rif. 0.8-2%)

RIASSUNTO

- β talassemia major come segni di laboratorio anemia, ipocromia, microcitosi, anisocitosi, poichilocitosi (varie forme GR) più gravi rispetto alle precedenti. In più si osservano gli eritroblasti che indica un'eritropoiesi in difficoltà.
- I GR possono avere ppt di Hb omotetrameri che causano emolisi, avere frammenti di nucleo, granuli di ferro.
- Assetto emoglobinico: HbA assente con tentativo di compensazione limitata da HbA2, rimane HbF in quantità importante che non risolve il problema perché ha troppa affinità per l'ossigeno.

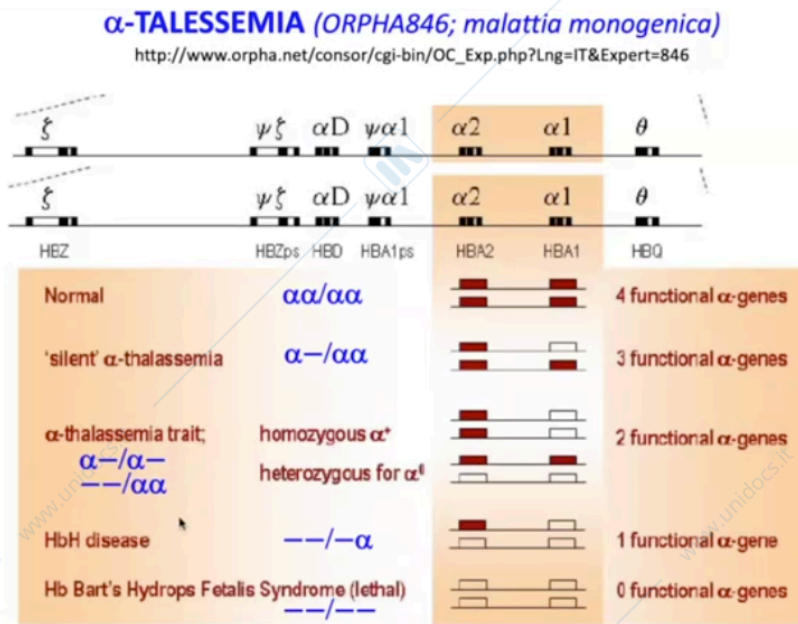
ALFA TALASSEMIA

Quello che complica per l'alfa talassemia, è che non abbiamo due geni, ma 4 geni alfa, sempre sul cromosoma somatico numero 16, e abbiamo due geni per cromosoma, 2 di origine paterna e 2 materna. Quindi quando ho tutti e 4 geni normali non mutati, si ha la condizione normale.

Posso avere varie combinazioni:

- talassemia silente: 1 singolo gene su 4 mutato

- tratto alfa: corrisponde alla perdita di due geni alfa, o comunque alla ridotta funzione di due geni alfa, corrisponde ad una condizione clinica silente, ma inizia ad essere



importante nella trasmissione della malattia, soprattutto nel caso in cui si incontrino due genitori entrambi portatori del tratto talassemico.

- Talassemia alfa major o malattia da HbH: La carenza, quindi la mutazione di 3 geni alfa e 1 solo che funziona è un po' corrispondente alla talassemia beta major. Si ha due Hb omotetrameri instabili: Hb Barts γ₄, HbH β₄.

- Idrope fetale da Hb di Bart, si osserva l'assenza completa di tutti e 4 geni. La

alfa ha una espressione molto precoce per cui la sua assenza va a inficiare tutto lo sviluppo prenatale, quindi una condizione non vitale. Sono tutte Hb Barts γ₄.

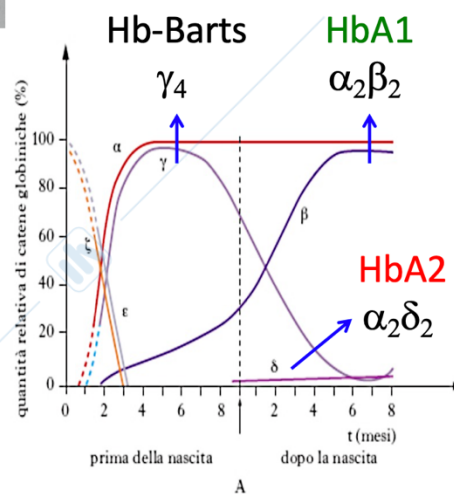
Al tratto alfa è suscettibile alla trasmissione di una patologia, e quindi è utile una consulenza genetica.

Tabella 25.32
Le α-talassemie: fenotipo clinico e fenotipo globinico

Fenotipo clinico	Fenotipo globinico	Fenotipo clinico
Portatore silente	-α/αα	Asintomatico
Tratto α-talassemico	- -/αα α-/α-	Lieve anemia emolitica e alcune cellule microcitiche

Adulto: Il profilo delle emoglobine non è alterato

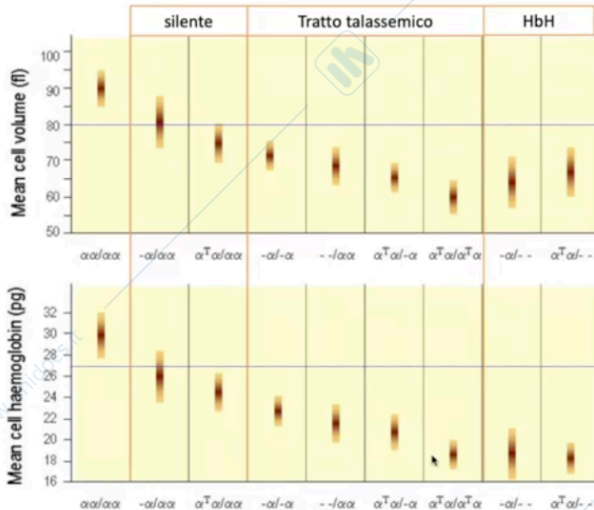
Neonato: Hb-Barts (γ₄) 2-10%



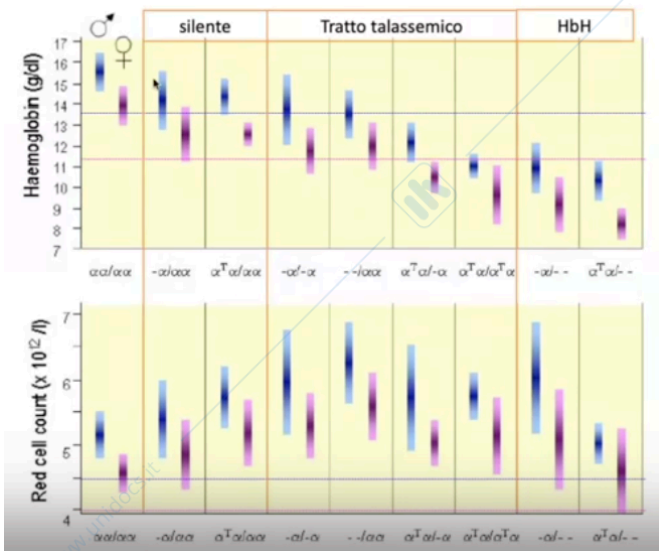
Finché siamo in una condizione di portatore di alfa tratto talassemico il profilo dell'emoglobina non viene alterato, per cui anche nel tratto talassemico, lo studio dell'assetto emoglobinico, non ci viene in aiuto, questo complica lo screening stesso, perché bisogna andare a fare un indagine genetica, non abbiamo un test di primo livello abbastanza sensibile da individuare il tratto alfa talassemico.

Potremo avere delle alterazioni nella vita prenatale, per vederle dovrei valutare il sangue cordonale durante la nascita, dovrei già supporre di andare incontro a un nascitura con un possibile tratto talassemico, nella vita fetale se si riduce un emoglobina alfa avrò un eccesso

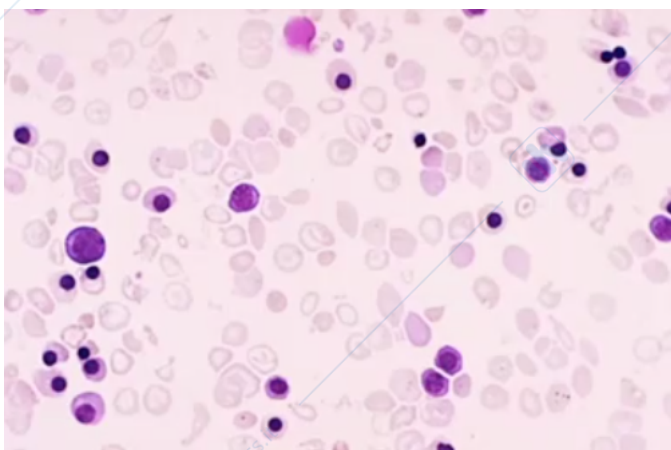
di emoglobina gamma che formerà un tetramero, questo ha un comportamento tipico nell'analisi cromatografica perché da questo picco molto precoce. Non è un momento di utilizzo di screening, è più una conferma di un sospetto diagnostico. Le altre Hb nell'adulto non ci danno un grosso aiuto.



Gli indici eritrocitari già nella condizione silente di tratto talassemico vedono ridursi la dimensione del GR, questo schema evidenzia come la riduzione del GR sia parallela alla riduzione del contenuto dell'Hb.



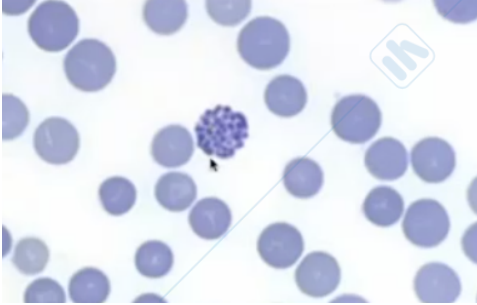
Ugualmente l'Hb totale va calando man mano, e qui vediamo che anche nell'Hb alfa, si ha il numero totale di GR e si osserva lo stesso tipo di compensazione, quindi aumentare eritropoiesi, quindi al calo dell'Hb, calo dimensioni GR, tende ad aumentare invece il numero di GR come tentativo di compensazione.



Neonato con alfa talassemia major: ho un solo gene alfa normale e gli altri 3 sono mutati, anche qui vale lo stesso discorso, le mutazioni possono essere diversi, dall'annullare completamente l'espressione di alfa a ridurla, anche qui la presentazione fenotipica cambia in un ampio spettro a seconda delle mutazioni che incontriamo. Dal punto di vista morfologico, le alterazioni dei GR che osserviamo sono le stesse che osserviamo nella talassemia beta, perché alla fine il

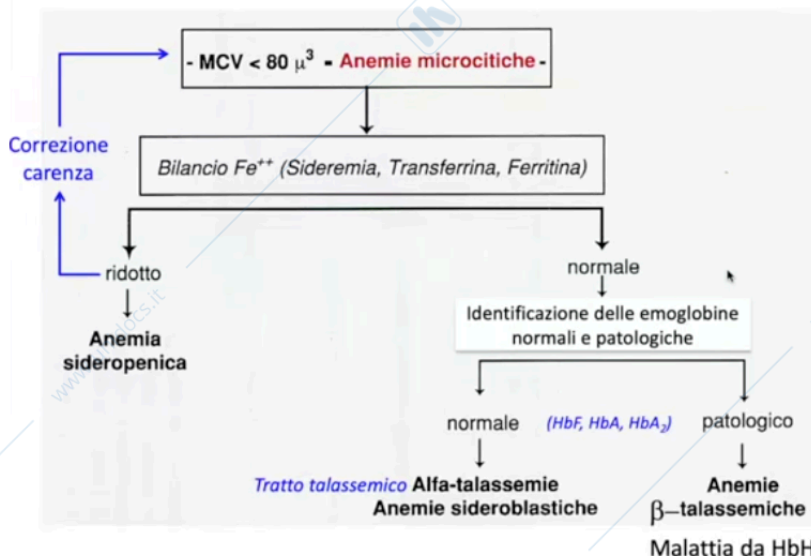
meccanismo patogenetico di espressione delle due malattie è speculare, quindi anche in questo caso si osserva eritroblasti in circolo, cellule con grande variabilità di forma

(chilocitosi), grande variabilità di dimensione (anisocitosi), sono ipocromici, ci sono cellule a bersaglio, ci sono un po' tutte le alterazioni morfologiche già descritte. Vedendo uno striscio non siamo in grado di distinguere se è una beta o una alfa, proprio per la sovrapposizione del meccanismo patogenetico.



un'altra colorazione che mette in evidenza dei depositi, siamo in un portatore di talassemia alfa, quindi i ppt saranno di globulina beta.

La grossa differenza tra talassemia alfa e beta in laboratorio è che con la beta siamo in grado più facilmente di individuare i portatori perché centra la modificazione tipica dell'emoglobina A₂ che ci indirizza subito, mentre per la talassemia alfa, si ha a disposizione sostanzialmente i valori dell'emocromo, quindi ci può comunque interessare, quello che possiamo considerare come discrepanza tra emocromo e assetto emoglobinico, quindi l'emocromo con anemia microcitica ipocromica, un assetto emoglobinico HBH, se siamo in grado di escludere una carenza di ferro potrebbe aiutarci a pensare ad un tratto alfa. Però abbiamo bisogno di più elementi da coordinare insieme per formulare un'ipotesi.



Quindi l'alfa talassemia e la beta talassemia sono una spiegazione alternativa alla microcitosi, e nel caso della anemia sideropenica, ci viene in aiuto lo studio del metabolismo del ferro, nel caso dello studio delle talassemie, a parte le indagini molecolari ci viene invece in aiuto lo studio dell'assetto emoglobinico tramite cromatografia. Abbiamo visto le due più frequenti cause di microcitosi.

RIASSUNTO

- Nell'α talassemia abbiamo 4 geni α su cromosoma 16 (2 paterni e 2 materni).
- Ci sono varie combinazioni: **normale** (nessun gene mutato), **silente** (1 mutato e 3 no) asintomatico, **tratto alfa** (2 mutati e 2 no) asintomatico ma rilevante nelle

trasmissioni, quindi è utile fare una consulenza genetica, **α talassemia major** (3 mutati e 1 no), **letale** (tutti mutati) non compatibile con la vita.

- Per il tratto alfa l'assetto emoglobinico non viene alterato, quindi bisogna fare un'indagine genetica per evitare che il futuro nascituro possa avere una talassemia α letale.

Nei segni di laboratorio si può osservare: $<MCV$, $<MCH$, $<Hb$, $>GR$ (meccanismo compensatorio)

Si può fare diagnosi valutando il sangue cordonale alla nascita, si osserva un eccesso di γ che formano un omotetramero prima della nascita, poi dopo la nascita ha un assetto emoglobinico normale.

- L' α talassemia major è comparabile alla β talassemia major, differenza nella diagnosi. Per la β è caratteristico la presenza di HbA2 mentre per la α la HbH.

ANEMIA MACROCITICA

Cosa può portare ad una anemia macrocitica, quindi alterazione dell'emoglobina ma determina un aumento della dimensione di un GR. questo viene detto macrocitica o anche megaloblastica quando i GR superano i 100 fL, ed è nuovamente una anemia carenziale. In questo caso non si ha carenza di ferro, ma carenza di folati o di vitamina B12, questa è una condizione dell'emocromo tipicamente macrocitica, il contenuto di Hb per GR può essere normale o ridotto. Quindi in questo caso l'elemento dell'emocromo che ci colpisce è la dimensione corpuscolare media (MCV).

La vitamina B12 viene assorbito al livello intestinale e nel metabolismo è un cofattore di una via metabolica che è alla base della produzione dei nucleotidi che vengono poi utilizzati nel momento della replicazione del DNA, quindi quando andiamo in carenza di folati e di vitamina B12, perché entrambi si utilizzano nella stessa via di sintesi, non è l'unica sintesi che utilizza la vitamina B12 per i folati, ma è il metabolismo per cui l'inefficienza porta all'anemia megaloblastica. Quindi quando vado in carenza di vitamina B12 e folati, vado a rallentare la sintesi dei nucleotidi, quindi vado a mettere in difficoltà quella che è la produzione, la replicazione del DNA stesso che è un evento estremamente importante nei compartimenti di attiva proliferazione cellulare, incluso il midollo, incluso il meccanismo di eritropoiesi, poi ci sono altri metabolismi che interessano l'utilizzo di vitamina B12 (non ci interessano al momento).

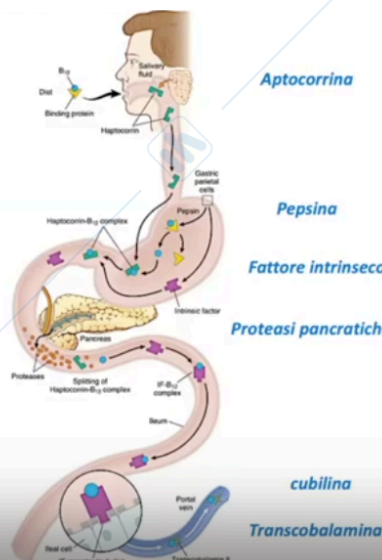
Carenza Vit B12

insufficiente apporto alimentare

- RDA: 2 – 5 μ g/day
- Riserve: 2-5 mg

Alterato assorbimento

- Deficit fattore intrinseco (an. Perniciosa, gastrectomia)
- Malattie intestinali (neoplastiche, parassiti...)
- Alterata funzione gastrica/pancreatica
- Resezione dell'ileo
- Alterata flora batterica



Andiamo in carenza di vitamina B12 perché c'è un insufficiente apporto alimentare, quindi un apporto che viene principalmente dalla carne, può esserci una causa di alterato assorbimento, manca quindi fattore intrinseco che è la proteina che viene prodotto al livello gastrico e che permette poi l'assorbimento intestinale della vitamina B12 e poi c'è una qualche malattia che interessa l'intestino, una qualche

disfunzione intestinale, possono essere malattie infiammatorie, neoplastiche, infezioni, la chirurgia. Le cause sono tante.

Andando in carenza, vado sostanzialmente a mettere in difficoltà tutto il compartimento midollare, per quanto riguarda la eritropoiesi vado a indurre uno sfasamento fra quello che è la maturazione del precursore del GR e la sintesi del DNA stesso, quindi c'è uno sfasamento tra quello che è la replicazione del DNA nucleare e la maturazione del citoplasma, per cui la sintesi del DNA viene rallentata quindi la replicazione nucleare viene rallentata, mentre comincia a crescere il citoplasma, e questo comporta la formazione di GR che arriveranno in circolo apparentemente normali, ma di nuovo con forme e dimensioni molto disomogenee, e in particolare siamo di fronte a GR grandi, sono più grandi del linfocita. I GR non sono gli unici ad essere interessati da questa difficoltà della disponibilità dei nucleotidi per cui, la difficoltà che si induce nella maturazione nucleare, si osservano delle alterazioni anche nei GB, per cui anche i neutrofili sono più grandi, posso arrivare ad osserva una neutropenia, una trombocitopenia in circolo, proprio perché tutto il compartimento midollare viene interessato. Un elemento che primariamente può colpire che può portare alla valutazione del paziente è la sintomatologia associata all'anemia: insorgenza di fatica, pallore, sono elementi di allarme che portano il soggetto dal medico, viene fatto un emocromo, potrà indirizzarsi sulla valutazione del metabolismo della vitamina B12 o del folato, è suggerito questa via dalla dimensione del GR. A questo possiamo fare la quantificazione della vitamina B12 e i folati in un campione di sangue, e quindi il risultato potrà confermare la supposizione di carenza e portare quindi alla supplementazione e ristabilirsi della condizione normale. Al completamento del processo diagnostico sarà a cura del medico anche cercare di capire, perché siamo arrivati alla carenza di vitamina B12, quindi se è un problema alimentare o un problema organico, associato ad un difetto di assorbimento, in questo caso il meccanismo è diverso, vado a mettere in difficoltà l'eritropoiesi al livello della replicazione del DNA, quindi metto in difficoltà il compartimento mitotico dei precursori dei GR. e questo si manifesta con GR molto grandi perché hanno minor tasso di visione portando comunque nel complesso ad una ridotta produzione di emoglobina, quindi ad una sintomatologia che nel soggetto si manifesta in maniera simile all'anemia carenziale di ferro.

RIASSUNTO

Anemia macrocitica, anemia carenziale di vitamina B12 o folati. Si nota un aumento dell'MCV. La vitamina B12 serve per la produzione di nucleotidi, quindi una sua carenza determina un rallentamento della sintesi del DNA nei vari compartimenti, soprattutto quelle con attiva proliferazione come è il midollo, dove avviene l'eritropoiesi, questo rallentamento della sintesi del DNA mette in difficoltà l'eritropoiesi che reagisce aumentando il citoplasma.

La sintomatologia sono le stesse dell'anemia, si fa emocromo e si trova anemia macrocitico, quindi si decide di fare la quantificazione di Vitamina B12 o folati in un campione di sangue, poi bisogna capire le cause della carenza che può essere data da insufficiente apporto alimentare, mancanza fattore intrinseco (problemi di assorbimento), malattie al livello intestinale, neoplasie.

La carenza di vitamina B12 colpisce tutto il compartimento midollare quindi anche i GB dove i neutrofili sono più grandi. Si osserva neutropenia, trombocitopenia.