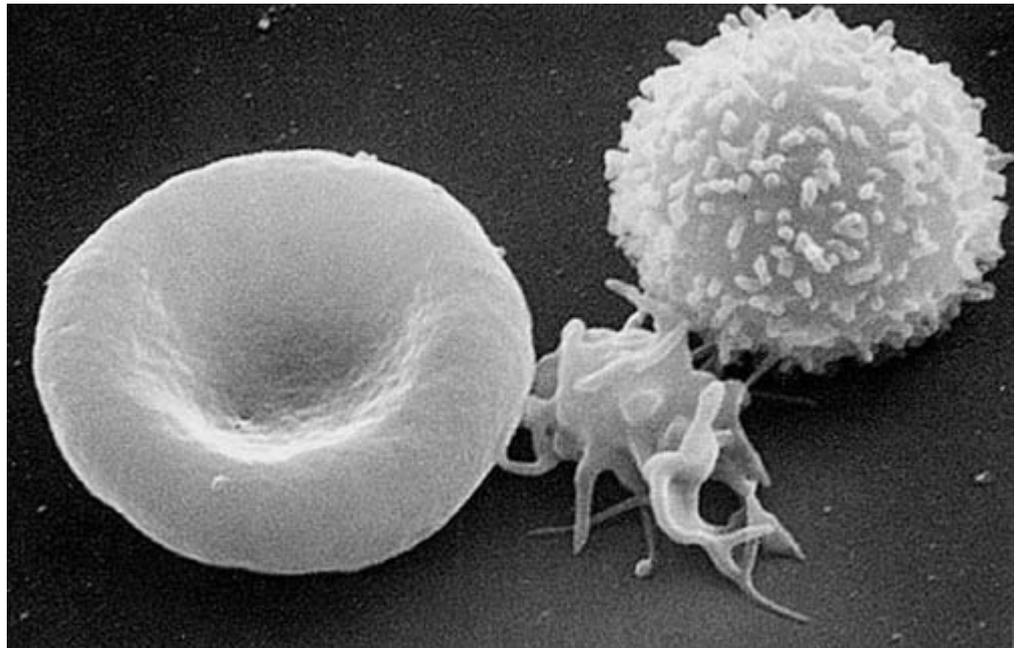


# EMATOLOGIA



# Sangue

## Plasma ematico (liquido)

m 46 ... 60 vol.%

f 53 ... 63 vol.%

sostanze alimentari  
metaboliti

ossigeno

rifiuti cellulari come CO<sub>2</sub>

sostanze biochimiche come  
ormoni, enzimi, tamponi

## Elementi figurati (corpuscoli)

ematocrito

m 40 ... 54 vol%

f 37 ... 47 vol.%

### eritrociti (globuli rossi)

m 4.6 ... 6.2 x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>

f 4.2 ... 5.4 x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>

### leucociti (cellule bianche)

4'000 ... 9'000 / mm<sup>3</sup>

granulociti

*basofili*

*eosinofili*

*neutrofilii*

agranulociti

*linfociti*

*monociti*

### trombociti (piastrine)

150'000 ... 380'000 / mm<sup>3</sup>

Il sangue è costituito da **plasma**  
ed **elementi figurati**

ERITROCITI

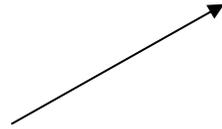
LEUCOCITI

TROMBOCITI (PIASTRINE)

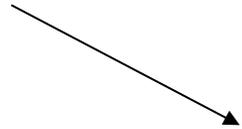
L'adulto ha circa 5 litri di sangue.

La quantità di sangue varia con età, tipo corporeo, sesso e metodo di misurazione.

LEUCOCITI  
(globuli bianchi)



GRANULOCITI  
(neutrofili, eosinofili, basofili)



AGRANULOCITI  
(linfociti, monociti)

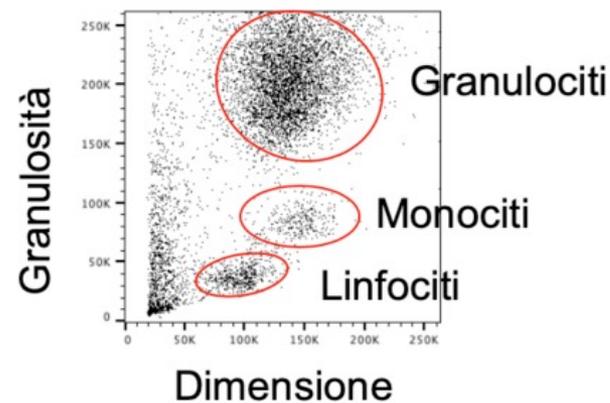
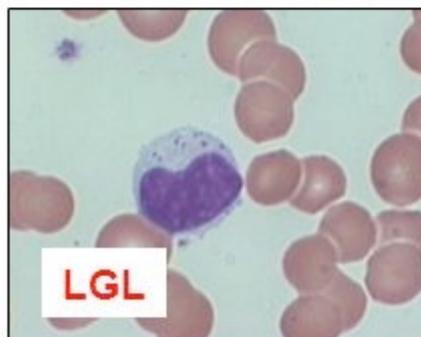
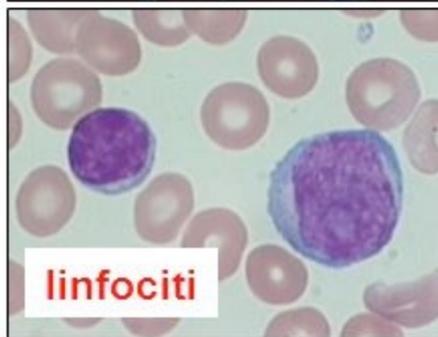
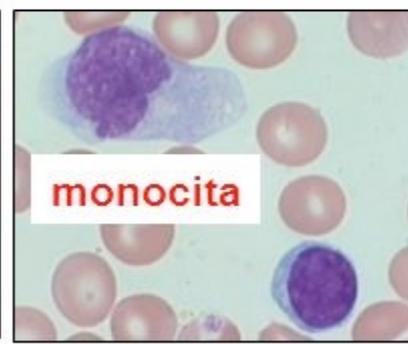
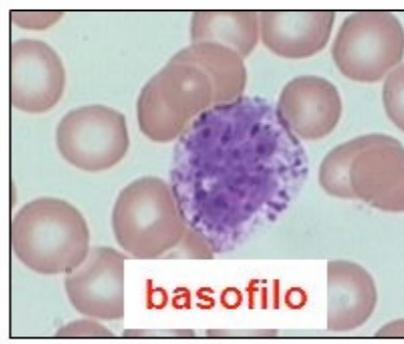
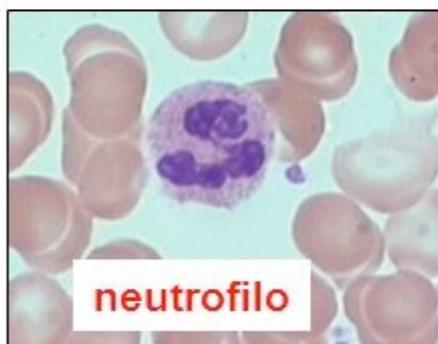
# I globuli bianchi nel sangue periferico

## formula leucocitaria

neutrofili 40 - 80 %  
linfociti 20 - 40 %  
monociti 2 - 10 %  
eosinofili 1- 6 %  
basofili <1- 2%

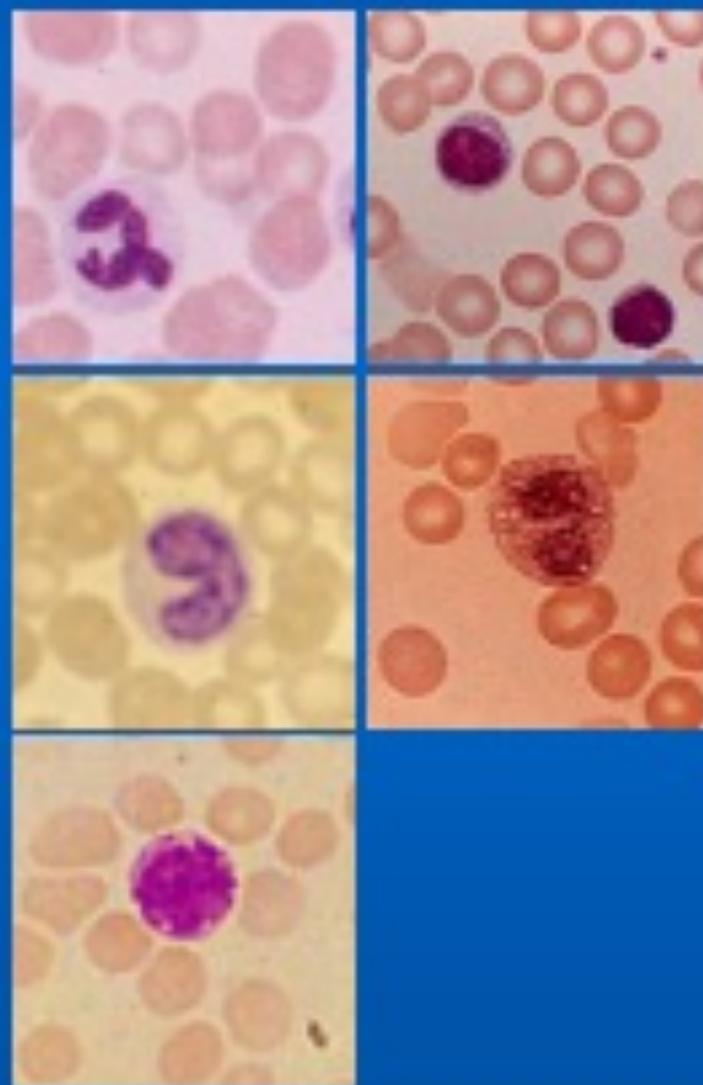
## numeri assoluti

neutrofili  $2-7 \times 10^9/L$   
linfociti  $1-3 \times 10^9/L$   
monociti  $0.2-1 \times 10^9/L$   
eosinofili  $0.02-0.5 \times 10^9/L$   
basofili  $0.02-0.1 \times 10^9/L$



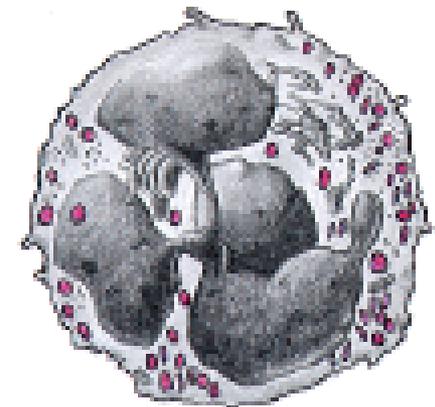
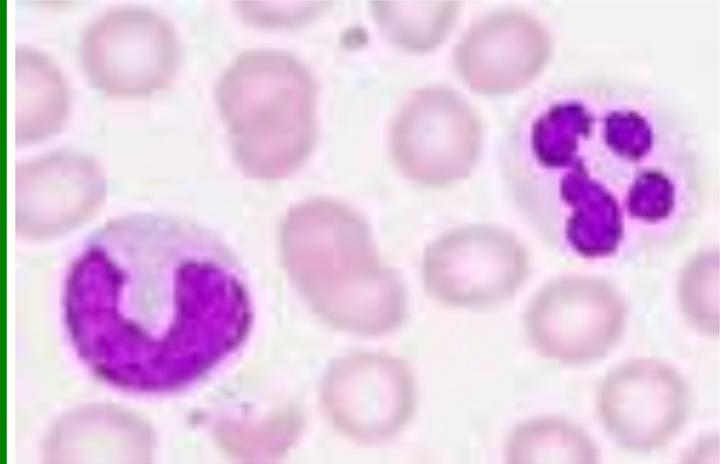
Si dice **formule leucocitaria** il rapporto % tra i diversi tipi di leucociti (varia nei differenti processi patologici):

- neutrofili 60-70% **65%**
- linfociti 20-30% **25%**
- monociti 2-8% **5%**
- eosinofili 2-4 % **3%**
- basofili < 1 % < 1 %



## NEUTROFILI:

Costituiscono circa il 65% del totale dei globuli bianchi. Molto mobili e attivi nelle fagocitosi. Capaci di diapedesi. Sono il primo tipo cellulare che raggiunge la sede di un'inflammazione. Hanno il citoplasma ricco di granuli. Esercitata la loro azione muoiono e vengono a costituire il pus.



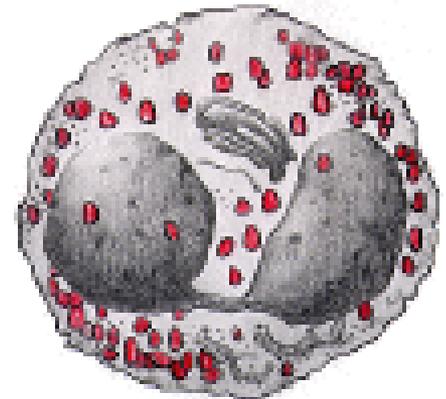
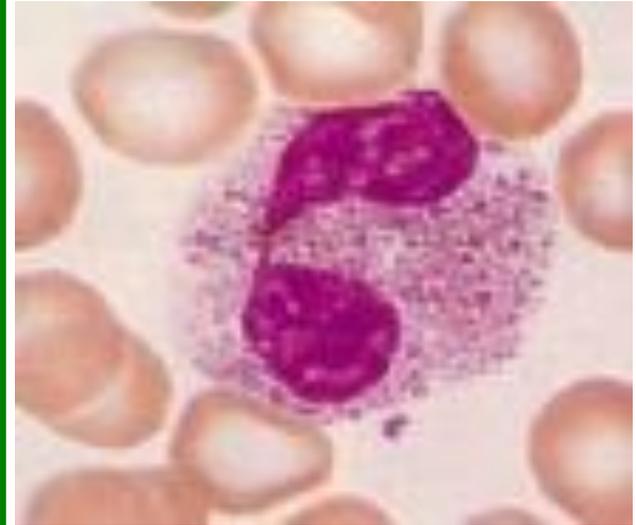
## EOSINOFILI:

Costituiscono circa il 3% dei globuli bianchi circolanti.

Numerosi nelle mucose dell'apparato respiratorio e digerente.

Capacità ridotta di fagocitosi.

Hanno il compito di difenderci dalle infezioni prodotte dai parassiti e sono coinvolti nelle reazioni allergiche.

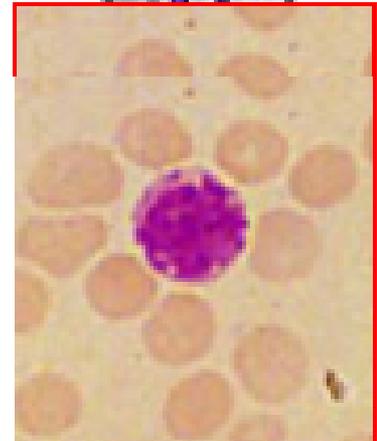
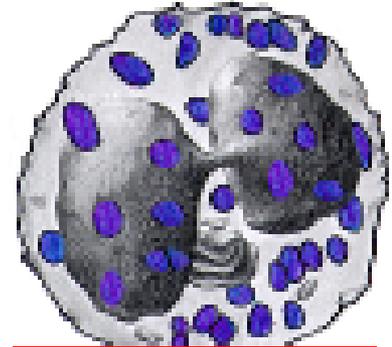


## BASOFILI:

Costituiscono meno dell'1% dei globuli bianchi circolanti. Mobili e capaci di diapedesi.

I granuli citoplasmatici contengono istamina e eparina (mediatori dell'inflammazione). Sono coinvolti nelle allergie.

Secernono IL-4, favorendo il differenziamento dei linfociti T helper verso il profilo Th2.

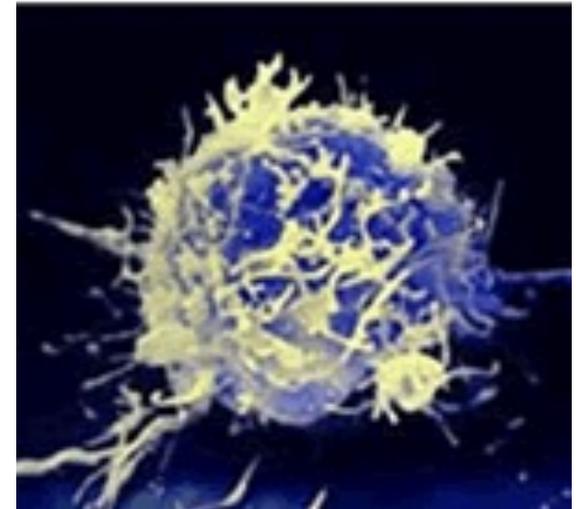
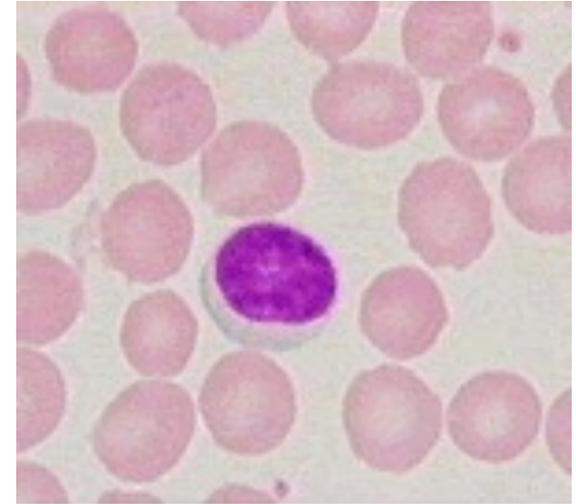


### LINFOCITI B e T:

I più piccoli tra i globuli bianchi e secondi come numerosità.

Costituiscono circa il 25% dei globuli bianchi circolanti.

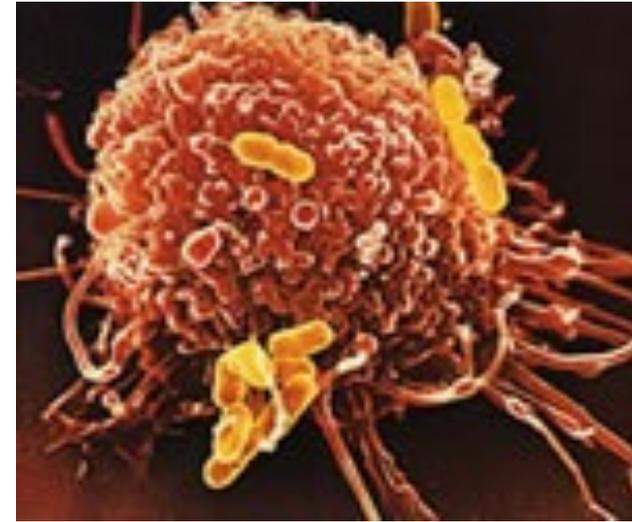
I linfociti T e B hanno un ruolo importante nel processo dell'immunità. I linfociti T citotossici attaccano direttamente una cellula infetta da virus o cancerogena; i linfociti T helper svolgono una funzione di ausilio per l'attività di altre cellule (linfociti B, macrofagi, linfociti T citotossici). I linfociti B producono anticorpi solubili contro specifici antigeni.



## MONOCITI:

Costituiscono circa il 5% dei globuli bianchi circolanti. Sono i leucociti più grandi e mobili.

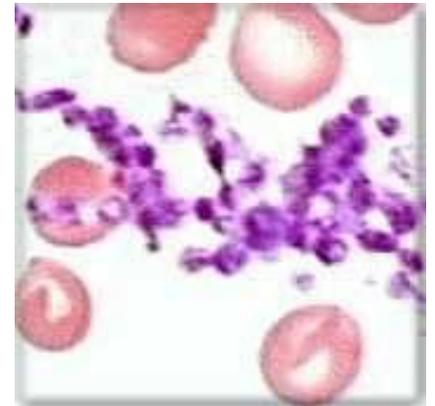
Dopo la diapedesi dal circuito sanguigno nei tessuti, i "monociti" si differenziano in "macrofagi".



## TROMBOCITI o PIASTRINE:

I trombociti sono frammenti citoplasmatici anucleati piatti e di forma da rotonda ad ovale. Si originano dal distacco di frammenti citoplasmatici dei megacariociti nel midollo osseo.

La funzione principale dei trombociti è l'emostasi.

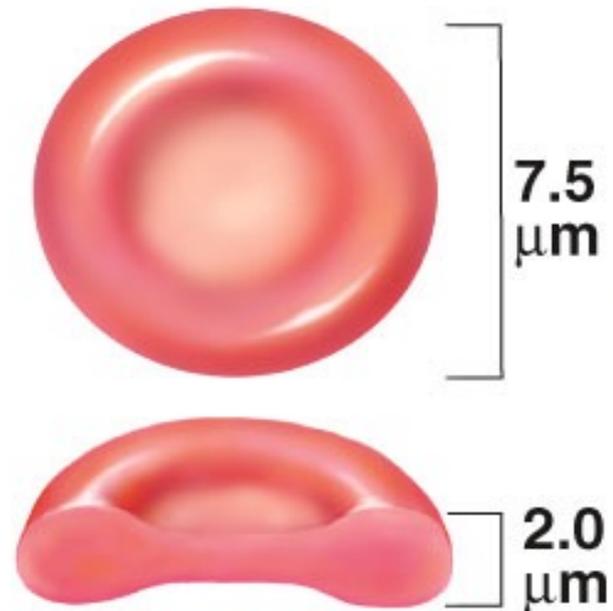


# Gli Eritrociti (RBCs)

- Sono le cellule del sangue più abbondanti (99.9%)
  - In ♂, 1μL di sangue contiene 4.5-5.9 milioni di RBCs
  - In ♀, 1μL di sangue contiene 3.5-5.0 milioni di RBCs
- Contengono l'**emoglobina** che lega e trasporta O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>
- Ciascun RBC è un disco biconcavo

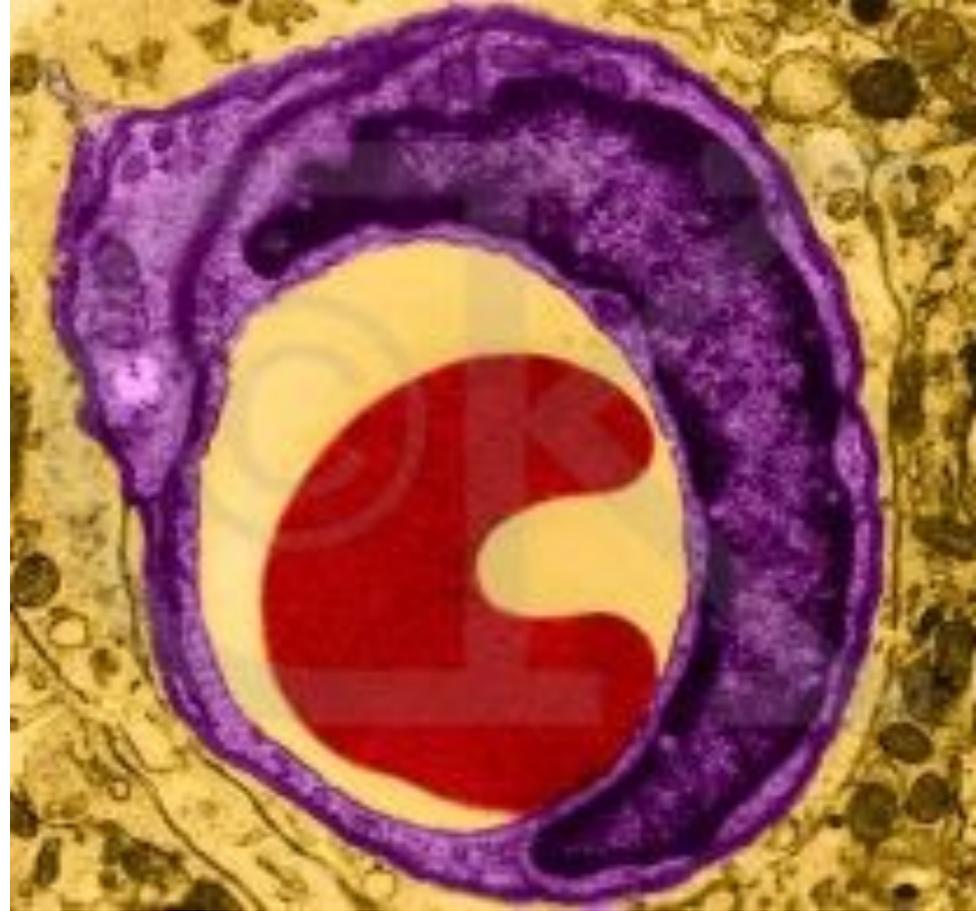
Diametro → 7.5 μm

Spessore → 2 μm



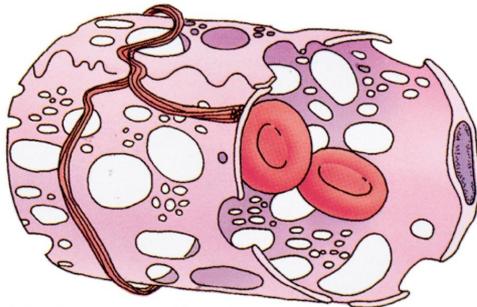
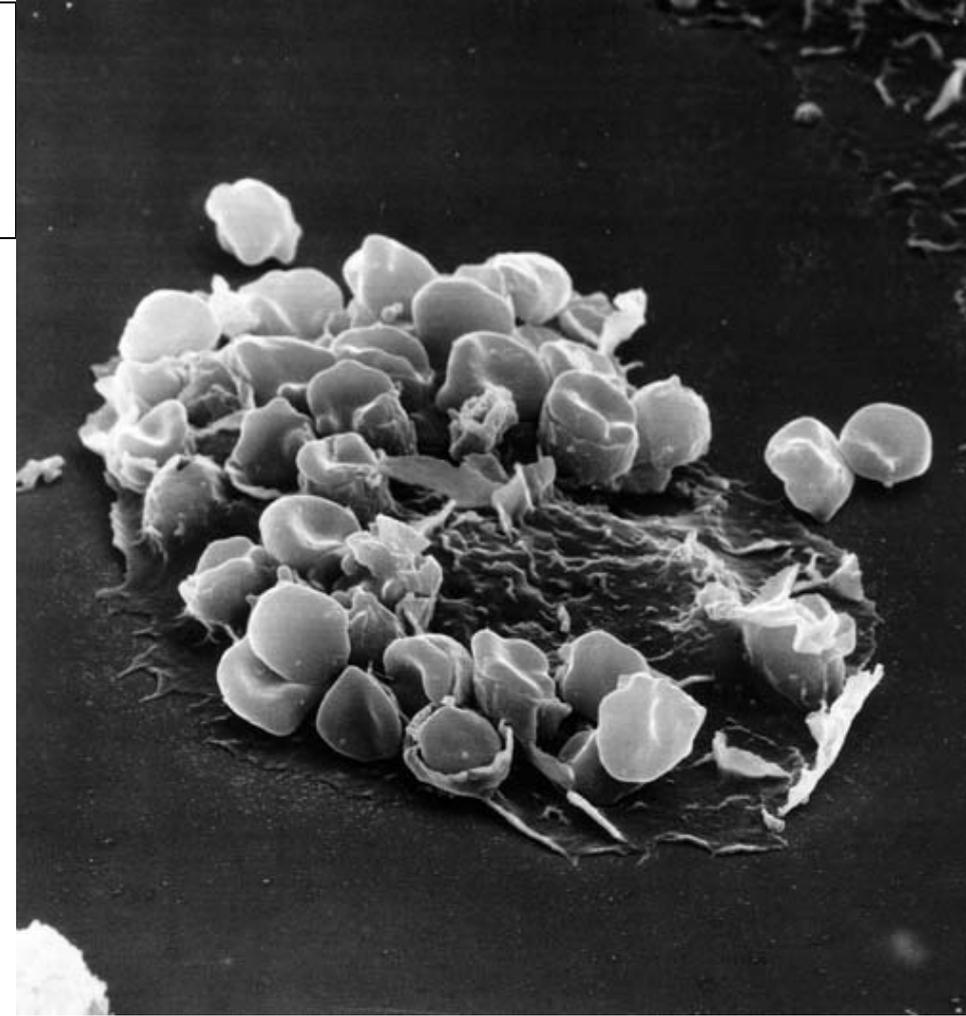
# Eritrociti

- Perché disco biconcavo?
  - Per fornire una larga superficie di scambio per l'ossigeno.
  - Per renderli capaci di curvarsi e flettersi quando entrano nei piccoli capillari.
- RBCs mancano di nucleo e della maggioranza degli organelli.



# Ciclo vitale di un RBC

- RBCs sono sottoposti ad incredibili stress meccanici.
- Dopo **≈120 giorni**, RBC vengono fagocitati dai macrofagi della milza e del fegato, una volta che escono attraverso le fenestrature dei sinusoidi splenici\* ed epatici.



C Capillare sinusoidale (discontinuo)

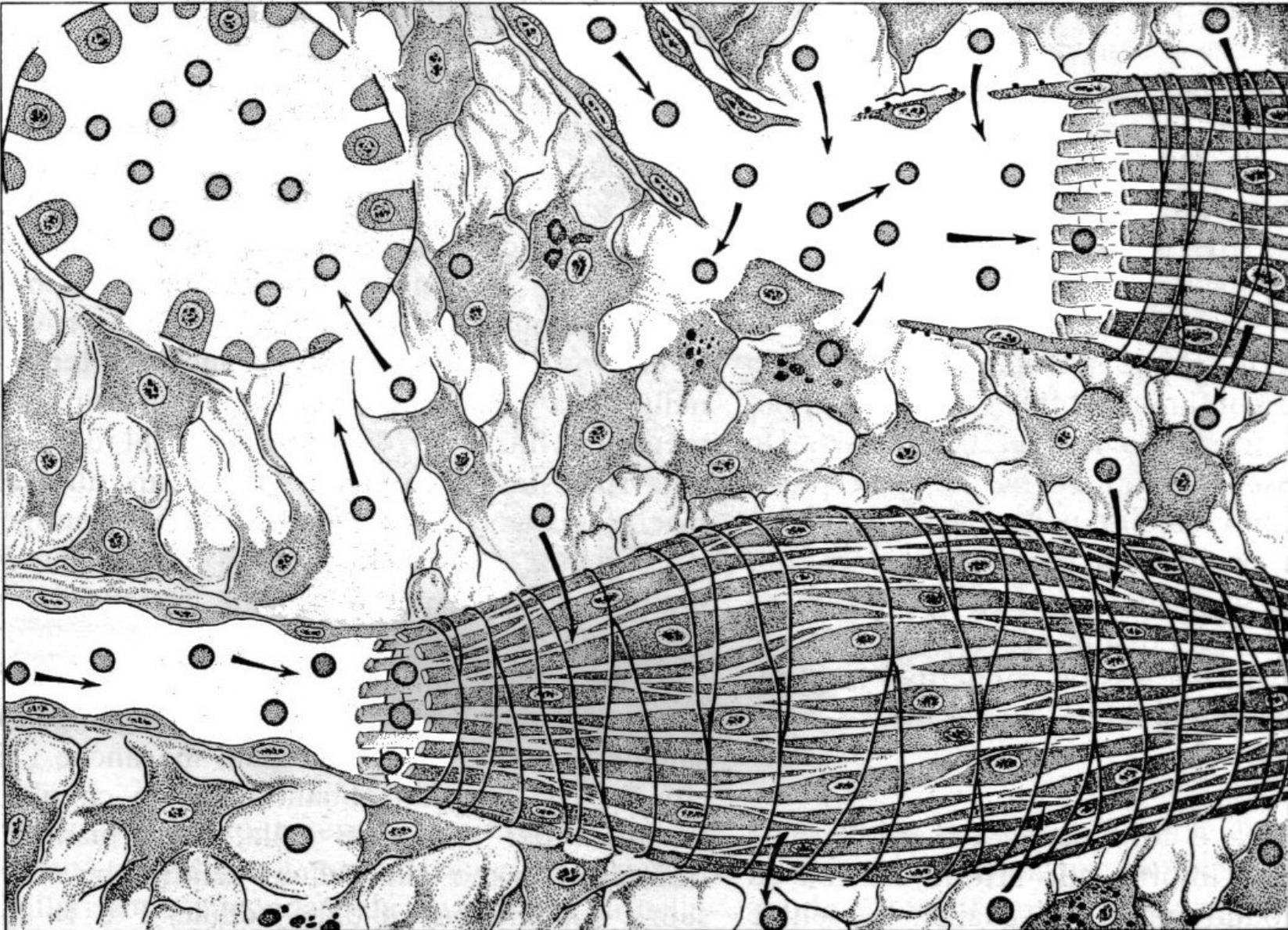
Un macrofago che sta fagocitando numerosi RBCs.

La polpa rossa della milza è attraversata da numerosi sinusoidi vascolari dalle pareti sottili, separati dai cordoni splenici, denominati anche cordoni di Billroth. Il rivestimento endoteliale dei sinusoidi è discontinuo e permette alle cellule ematiche di passare tra sinusoidi e cordoni. I cordoni contengono un labirinto di macrofagi lassamente connessi mediante lunghi processi dendritici che creano un filtro sia fisico sia funzionale. Attraversando la polpa rossa, il sangue segue due strade per raggiungere le vene spleniche. Una parte fluisce attraverso i capillari nei cordoni splenici, da cui poi gradualmente filtra nei sinusoidi splenici circostanti per raggiungere le vene; questa è la cosiddetta circolazione "aperta" o compartimento lento. L'altro percorso è un circuito "chiuso", in cui il sangue passa rapidamente e direttamente dai capillari alle vene spleniche. Sebbene solo una piccola parte del sangue che entra nella milza segua il percorso aperto, nell'arco di una giornata l'intero volume ematico attraversa i letti di filtrazione dei cordoni splenici, dove le cellule ematiche vengono strettamente controllate dai macrofagi della polpa rossa.

La milza svolge quattro funzioni che possono rivestire un ruolo rilevante in varie condizioni patologiche:

1. *Fagocitosi delle cellule ematiche e di materiale particolato.* Come discusso nella sezione dedicata alle anemie emolitiche (Cap. 14), i globuli rossi vanno incontro a un'estrema deformazione durante il passaggio dai cordoni ai sinusoidi. Nelle condizioni in cui la deformabilità eritrocitaria è ridotta, gli eritrociti restano intrappolati nei cordoni, dove sono rapidamente fagocitati dai macrofagi.

# CIRCOLAZIONE SPLENICA



Sinusoide  
(circolazione  
aperta)

Cordone  
di Billroth

Sinusoide  
(circolazione  
chiusa)

Gonçalves

## EMOPOIESI

La formazione e maturazione di tutti i tipi di cellule del sangue a partire dai loro precursori avviene **nell'ADULTO** a livello del **midollo osseo**. Durante lo **SVILUPPO FETALE** l'emopoiesi si svolge dapprima nel **sacco vitellino**, successivamente nel **fegato** e nella **milza** ed infine nelle **ossa**.

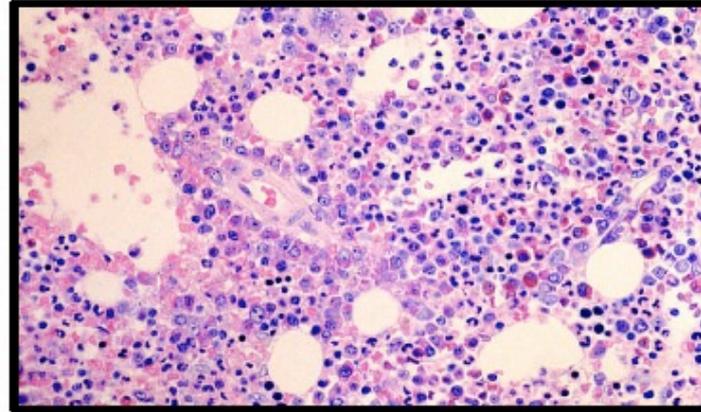
Il midollo osseo funzionante è limitato alla **diploe** (parte di osso spugnoso contenuta tra le due lamine di osso compatto) delle ossa della **volta cranica**, alle **costole**, allo **sterno**, ai **corpi vertebrali** e **all'osso spugnoso di alcune ossa corte e delle estremità prossimali del femore e dell'omero**.

## Il midollo osseo è un tessuto complesso



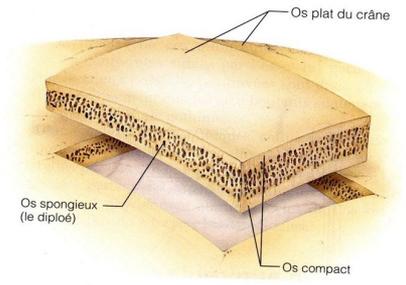
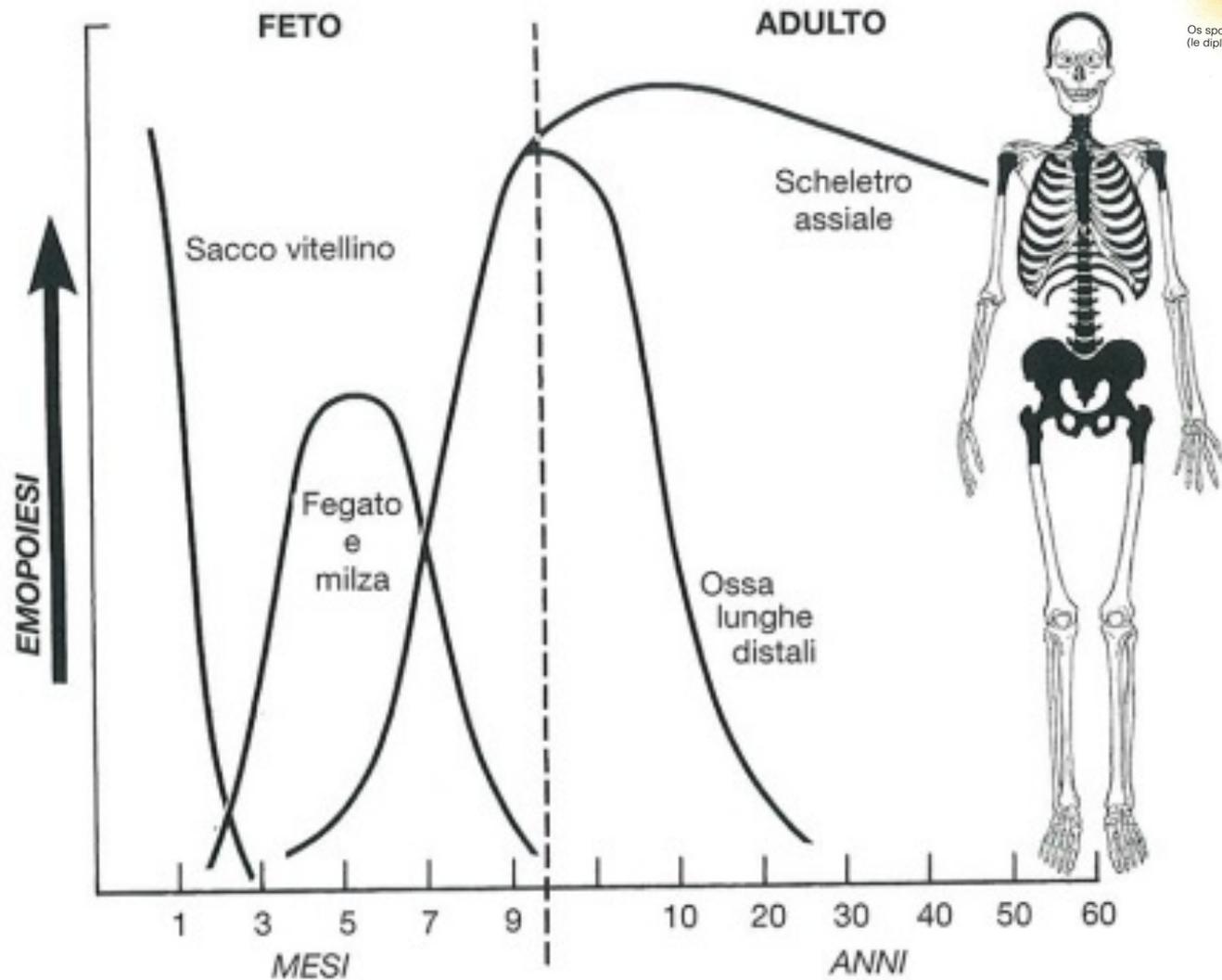
### **OSSO:**

- matrice ossea (trabecole)
- osteoclasti
- osteoblasti



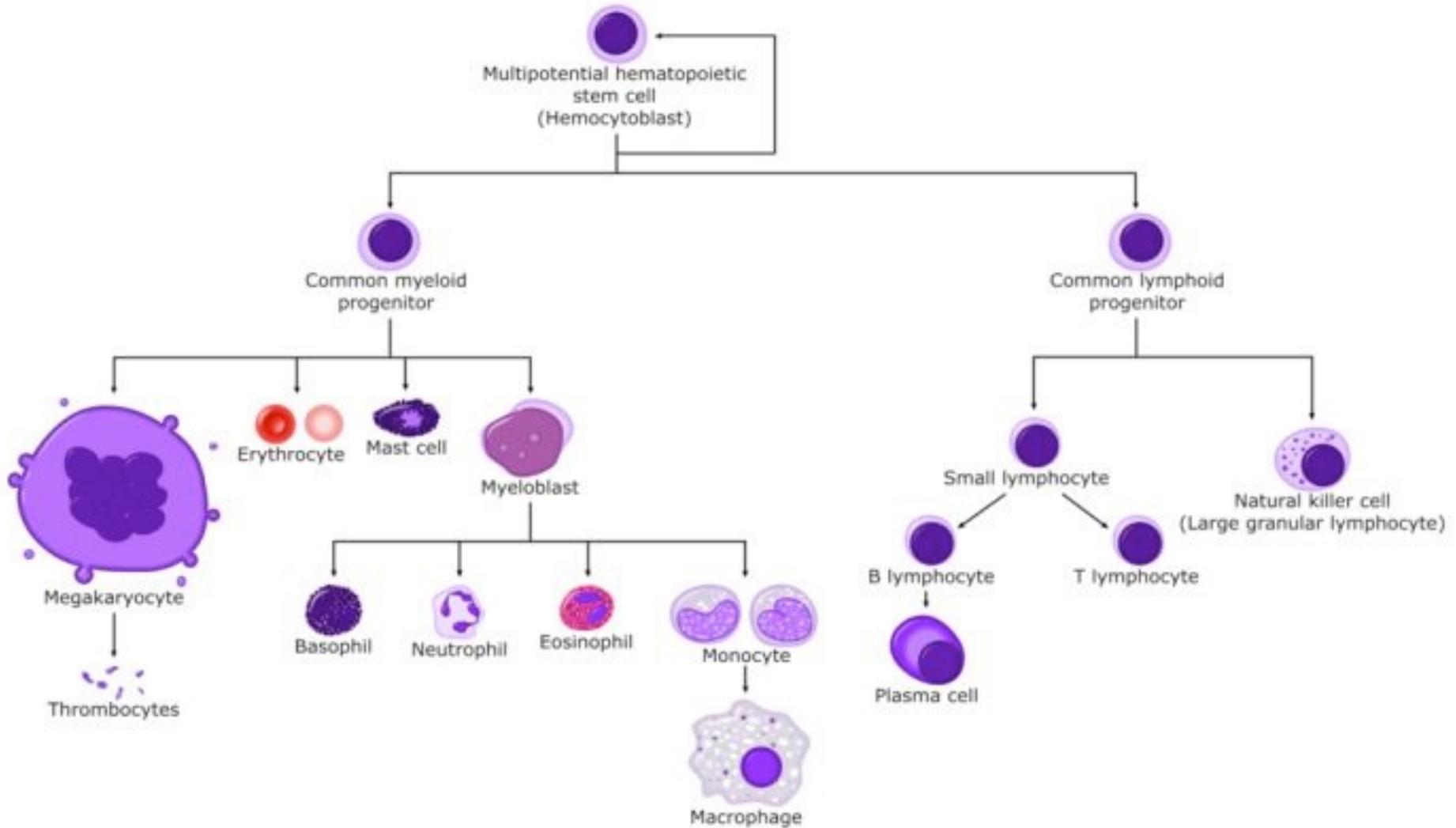
### **MIDOLLO OSSEO**

- cellule emopoietiche
- vasi
- cellule stromali
  - adipociti
  - fibroblasti
  - macrofagi
  - mastociti
- matrice extracellulare



**Ossa lunghe distali: femore, tibia, omero**  
**Scheletro assiale: ossa craniche, vertebre, costole e sterno**

Globuli rossi, globuli bianchi e piastrine derivano da **un'unica cellula staminale emopoietica PLURIPOTENTE**.



# Emocromo

- **L'esame emocromocitometrico:** insieme di test per valutare la parte corpuscolata del sangue e il suo rapporto con la parte liquida
- **Eritrociti:**
  - quantità
  - dimensione
  - forma
  - contenuto di emoglobina
- **Globuli bianchi:**
  - quantità
  - sottoclassi
- **Piastrine**
  - quantità
- **Ematocrito:** rapporto tra la massa di tutte queste cellule e il volume della parte liquida.

Il campione di sangue, pochi millilitri, si preleva comunemente nell'adulto dalla vena di un braccio. Il sangue prelevato viene conservato a temperatura ambiente in una provetta contenente un anticoagulante. Viene quindi analizzato con un macchinario elettronico (detto contaglobuli) che in poche decine di secondi fornisce i risultati.

# Ematocrito

- Volume in percentuale di sangue intero occupato dalla componente cellulare
- In un ♂ in media è il 46% (range 40-54%)
- In una ♀ in media è il 42% (range 38-47%)
- Si determina per centrifugazione di un campione di sangue reso non coagulabile.

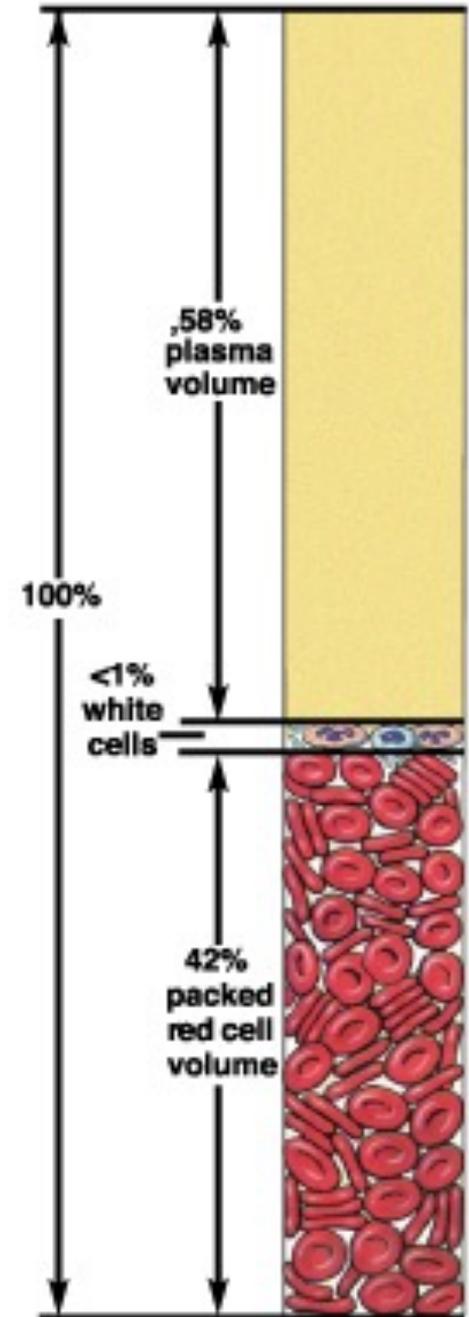


Tabella 2.5 Esame emocromocitometrico: valori normali nell'adulto

|   | Uomo                  | Donna                 |
|---|-----------------------|-----------------------|
| Ematocrito  | 40-54%                | 38-47%                |
| Emoglobina  | 13,5-18 g/dl          | 12-16 g/dl            |
| Eritrociti/ $\mu$ l                                   | $4,6-6,2 \times 10^6$ | $4,2-5,4 \times 10^6$ |
| Leucociti/ $\mu$ l                                    | $4,5-11 \times 10^3$  | $4,5-11 \times 10^3$  |
| Piastrine/ $\mu$ l                                    | $150-450 \times 10^3$ | $150-450 \times 10^3$ |
| Volume corpuscolare medio (MCV)                       | 80-98 fl              | 81-99 fl              |
| Emoglobina corpuscolare media (MCH)                   | 26-32 pg              | 26-32 pg              |
| Concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCHC) | 32-36%                | 32-36%                |
| Ampiezza di distribuzione degli eritrociti (RDW)      | 11,6-14,6%            | 11,6-14,6%            |
| Reticolociti  | 0,5-2,5%              | 0,5-2,5%              |

**CLEM** LABORATORIO ANALISI CLINICHE

Sig.

**FERNANDO**

Rif.N. del 26/05/05

| <b>ESAME</b>                     | <b>ESITO</b>  |                     | <b>VALORI NORMALI</b> |
|----------------------------------|---------------|---------------------|-----------------------|
| <b>ESAME EMOCROMOCITOMETRICO</b> |               |                     |                       |
| Globuli bianchi                  | <b>11.600</b> | /mmc                |                       |
| Globuli rossi                    | 5.160.000     | /mmc                |                       |
| Emoglobina                       | 13,70         | gr%                 |                       |
| Ematocrito                       | 42,0          | %                   |                       |
| MCV (Vol.corpuscolare medio)     | 85,0          | micron <sup>3</sup> |                       |
| MCH (HB Corpuscolare media)      | 26,5          | pg                  |                       |
| MCHC (Conc.HB corp. media)       | 33,0          | %                   |                       |
| <b>FORMULA LEUCOCITARIA</b>      |               |                     |                       |
| granulociti neutrofilii          | 64,0          | %                   | 37 - 80               |
| granulociti eosinofili           | 3,0           | %                   | 0 - 7                 |
| granulociti basofili             | 0,0           | %                   | 0 - 2                 |
| monociti                         | 4,0           | %                   | 0 - 12                |
| linfociti                        | 29,0          | %                   | 10 - 50               |
| <b>ESAME MORFOLOGICO</b>         |               |                     |                       |
| SERIE ROSSA                      | NELLA NORMA   |                     |                       |
| SERIE BIANCA                     | NELLA NORMA   |                     |                       |
| PIASTRINE                        | 286.000       | /mmc                | 150.000 - 450.000     |
| Osservazioni                     |               |                     |                       |

## VELOCITA' DI ERITROSEDIMENTAZIONE (VES)

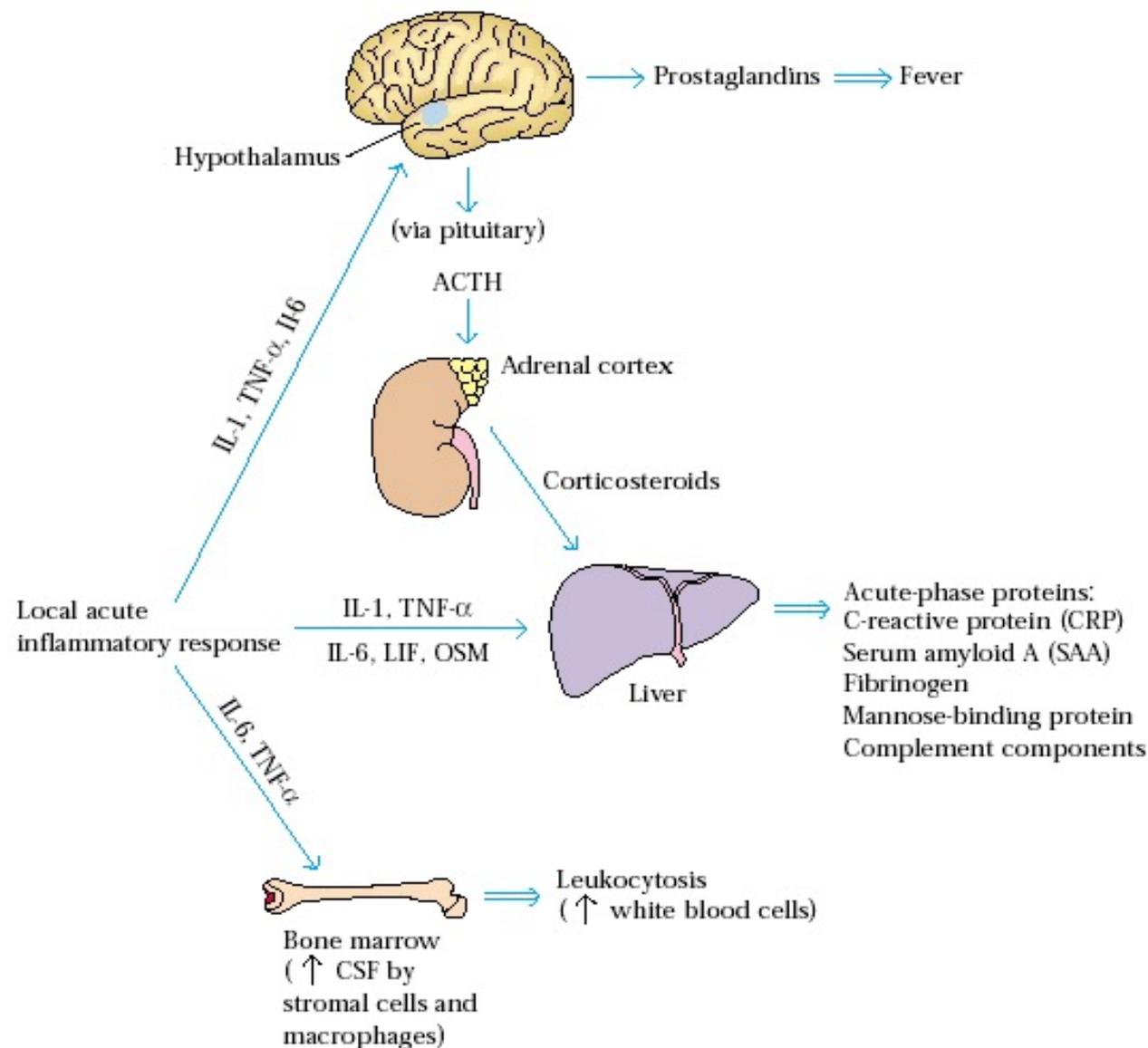
E' un esame che si effettua sul sangue, reso incoagulabile e messo in una provetta graduata di piccolo calibro in posizione verticale, determinando la **velocità con cui gli eritrociti si separano dal plasma depositandosi sul fondo**. Il risultato è calcolato in **millimetri di plasma** presenti nella parte superiore della provetta dopo **60 min**.



VALORI NORMALI: 1-10 millimetri all'ora (maschio); 1-15 millimetri all'ora (femmina).

## Velocità di eritrosedimentazione (VES)

- E' un esame classico e semplice, di possibile utilizzo come **indice** della presenza di **uno stato infiammatorio**.
- Il principio su cui si fonda è che i **globuli rossi sospesi in una colonnina verticale di sangue**, in presenza di anticoagulante, **tendono ad impilarsi in *rouleaux* e a precipitare**. Tale precipitazione è ostacolata dalla carica negativa di superficie degli eritrociti (per la presenza di residui di acido sialico dei globuli rossi).
- E' possibile però che tale negatività si neutralizzi quando sono presenti nel plasma proteine a carica positiva che favoriscono perciò l'impilamento delle emazie.
- L'aumento della VES si può osservare nelle situazioni fisiologiche o patologiche che implicano un aumento di **fibrinogeno o della proteina C reattiva** (infezioni, stati infiammatori e neoplastici, gravidanza).
- Il valore della VES è influenzato dall'ematocrito: tanto minore è ematocrito tanto maggiore è la VES.



**FIGURE 15-13** Overview of the organs and mediators involved in a systemic acute-phase response. IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$ , which are produced by activated macrophages at the site of inflamma-

tion, are particularly important in mediating acute-phase effects. LIF = leukemia inhibitory factor; OSM = oncostatin M.

# MALATTIE DEI GLOBULI ROSSI

## ANEMIE

La funzione degli eritrociti consiste nel trasporto di ossigeno.

Si definisce anemia una **riduzione della capacità di trasporto dell'ossigeno da parte del sangue**. Poiché nella maggior parte dei casi ciò consegue a diminuzione dei globuli rossi, l'anemia può essere definita come la **riduzione al di sotto dei limiti normali della massa dei globuli rossi circolanti**.

L'anemia viene definita come la **riduzione**, al di sotto della norma, dell'**EMATOCRITO** (volume occupato dalla componente cellulare) o come una **diminuzione della concentrazione ematica di emoglobina**.

La classificazione delle anemie viene fatta secondo diversi criteri:

- i) sulla base del contenuto di Hb (*anemia ipocromica o normocromica*)
  - ii) sulla base delle dimensioni dei GR (*anemia normocitica, microcitica o macrocitica*)
- ii) da un punto di vista fisiopatologico → *anemie da alterata produzione o da perdita o distruzione eccessiva dei GR*

- i) ANEMIE DA ALTERATA PRODUZIONE ERITROCITARIA
  - stati carenziali (es: carenza di ferro o di vit B12 e folati,)
  - midollo emopoietico funzionante ridotto o assente (aplasia midollare da farmaci, radiazioni; infiltrazione neoplastica del midollo osseo)
  - sintesi Hb anomala o ridotta (es:  $\beta$ -talassemia)
  
- ii) ANEMIE DA PERDITA o DISTRUZIONE ECCESSIVA DI ERITROCITI
  - emorragia
  - emolisi (es. anemia falciforme e  $\alpha$ -talassemia)

## SINTOMATOLOGIA LEGATA ALL'ANEMIA

Disturbi **generali** e **comuni** a tutti i tipi di anemie:

- Cefalea, facile affaticamento, tachicardia, mancanza del respiro (dispnea) da sforzo, facile irritabilità, insonnia, pallore; disturbi da diminuita ossigenazione, es. crampi notturni.
- Lesioni della cute e annessi cutanei: cute secca e anelastica, capelli sottili, fragili, radi, unghie fragili, opache, rigate, appiattite o addirittura concave.
- Lesioni alle mucose del cavo orale con labbra fessurate da ragadi agli angoli della bocca, mucosa orale arrossata, lingua liscia, levigata e pallida.

# APPROCCIO DIAGNOSTICO

PRELIEVO DI SANGUE per valutare:

- CONCENTRAZIONE DI Hb ed EMATOCRITO
- INDICI CORPUSCOLARI
- CONTA RETICOLOCITARIA
- MORFOLOGIA dei GR nello striscio di sangue periferico (l'entità delle malformazioni morfologiche è proporzionale alla gravità dell'anemia)
- METABOLISMO DEL FERRO

A volte è necessario procedere con il prelievo di un campione di midollo osseo.

## **Emoglobina**

Si esprime in g/100 mL

Si misura con il **Metodo della Cianometemoglobina:**

L'emoglobina\* viene trasformata dal reattivo cianuro di potassio + ferricianuro (soluzione DRABKIN) in cianometemoglobina, pigmento rosso. La quantità di pigmento sviluppato, direttamente proporzionale all'emoglobina, viene determinata leggendo mediante spettrofotometro a 540 nm di lunghezza d'onda

\* L'emoglobina viene estratta dai GR diluendo il sangue in una soluzione ipotonica

## INDICI CORPUSCOLARI:

1. **MCV** = volume corpuscolare medio: 80 - 96 fl
2. **MCH** = contenuto cellulare medio di Hb: 27 - 33 pg
3. **MCHC** = concentrazione cellulare media di Hb: 32 – 36 g/dl
4. **RDW** (Red Cell Distribution Width)= ampiezza di distribuzione degli eritrociti (indice di “variazioni delle dimensioni cellulari” o di ANISOCITOSI): 11.5% - 14.5%

## 1. VOLUME CORPUSCOLARE MEDIO (MCV)

$$\text{MCV} = \frac{\text{EMATOCRITO}}{\text{N}^\circ \text{ globuli rossi/l}}$$

Valori normali **80-96 fl**

*femtolitri: fl=10<sup>-15</sup>l*

*Es.*

*EMATOCRITO 0.45 l/l*

*Conta eritrociti 5x10<sup>6</sup>/μl*

*5x10<sup>9</sup>/ml=5x10<sup>12</sup>/l ⇒ 5x10<sup>12</sup>/l occupano un volume di 0.45l*

*MCV = 0.45/5x10<sup>12</sup> = 90x10<sup>-15</sup>l = 90 fl*

# 1. VOLUME CORPUSCOLARE MEDIO (MCV)

Aumento:

- carenza vit.B12
- carenza di folati

Diminuzione:

- emoglobinopatie (talassemia)
- carenza di ferro

## 2. CONTENUTO CELLULARE MEDIO DI Hb (MCH)

(MCH)= contenuto medio, espresso in pg (peso!!!) dell'Hb per eritrocita.

$$\text{MCH} = \frac{\text{Hb (gr/l)}}{\text{N}^\circ \text{ globuli rossi/l}}$$

Valori normali 27-33 pg

*picogrammi: pg=10<sup>-12</sup> g*

*Es.:*

*Hb 150g/l (15 g/dl)*

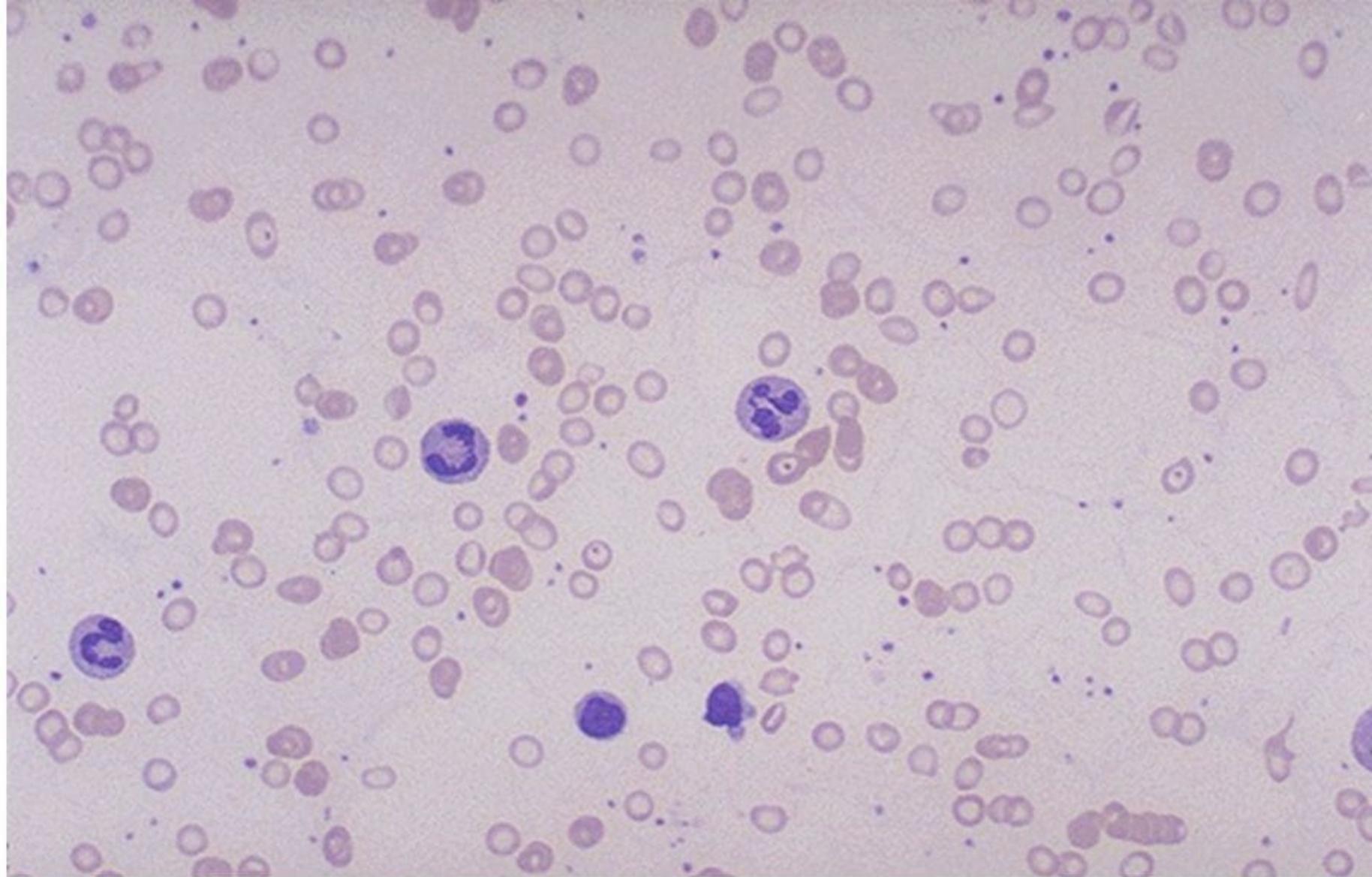
*Conta eritrociti 5x10<sup>12</sup>/l*

$$\text{MCH} = \frac{150\text{gr/l}}{5 \times 10^{12}/\text{l}} = 30 \times 10^{-12}\text{g} = 30 \text{ pg}$$

L'MCH è di solito strettamente correlato con il MCV ed aumenta o diminuisce parallelamente a questo parametro

Se il valore di MCH è alto, mentre il numero totale di eritrociti è basso, significa che l'organismo sta producendo un numero minore di globuli rossi, ma più "ricchi" di emoglobina (es anemia megaloblastica).

Nel caso dell'anemia sideropenica MCH e MCV sono bassi.



Anemia ipocromica

I globuli rossi sono più piccoli e più pallidi del normale.

E' presente anche anisopoichilocitosi (eterogeneità di dimensione e forma).

Il volume (MCV) ed il contenuto emoglobinico (MCH) sono parametri importanti nella valutazione delle anemie e di altre patologie ematologiche.

Rispetto al volume la cellula può essere definita normocita, microcita o macrocita.

Rispetto al contenuto di Hb si può parlare di eritrociti Normocromici, ipocromici o ipercromici.

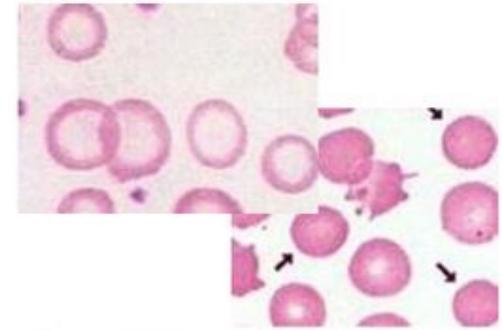
### 3. CONCENTRAZIONE CELLULARE MEDIA DI Hb (MCHC)

Rappresenta la **concentrazione emoglobinica media** in un dato **ematocrito** (volume di emazie) e si calcola dalla concentrazione emoglobinica e dall'ematocrito.

$$MCHC = \frac{Hb \text{ (g/dl)}}{EMATOCRITO}$$

Valori normali 32-36 g/dl  
Valori inferiori

**NORMOCROMICO**  
**IPOCROMICO**

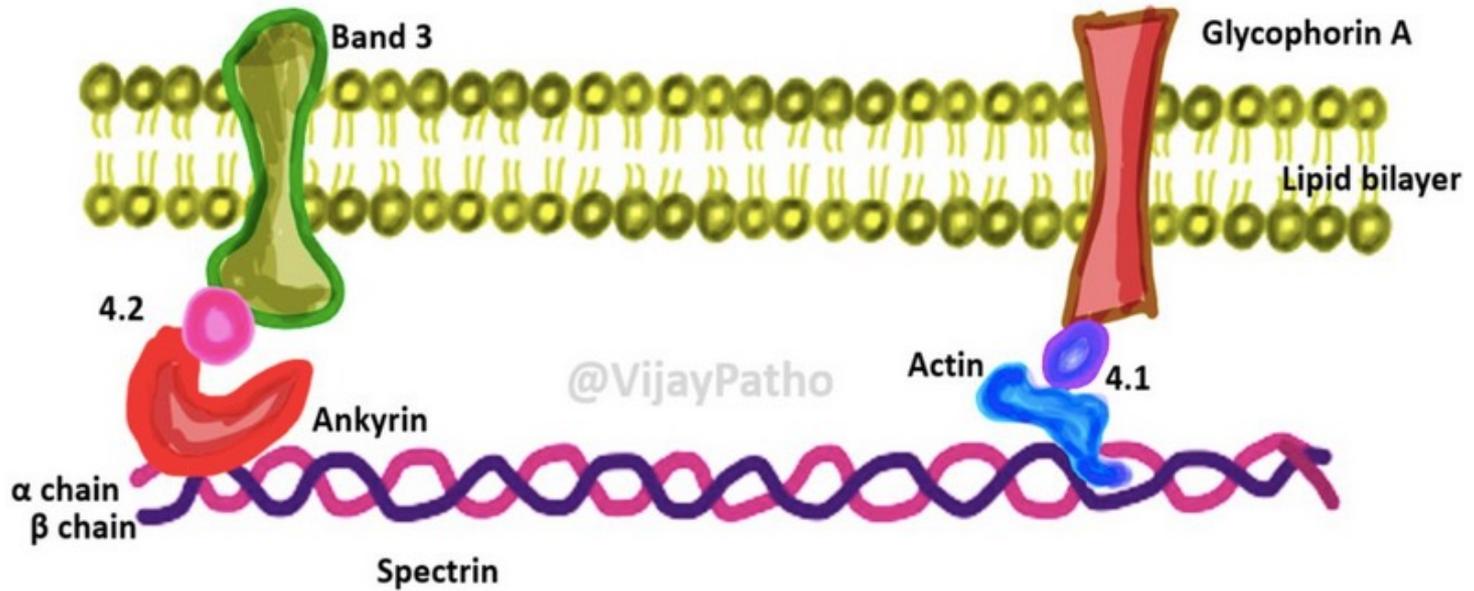


*Es.:*  
*EMATOCRITO = 45 %*  
*Hb 15g/dl*  
 *$MCHC = \frac{15 \text{ g/dl}}{0.45 \text{ dl/dl}} = 33.3 \text{ g/dl}$*

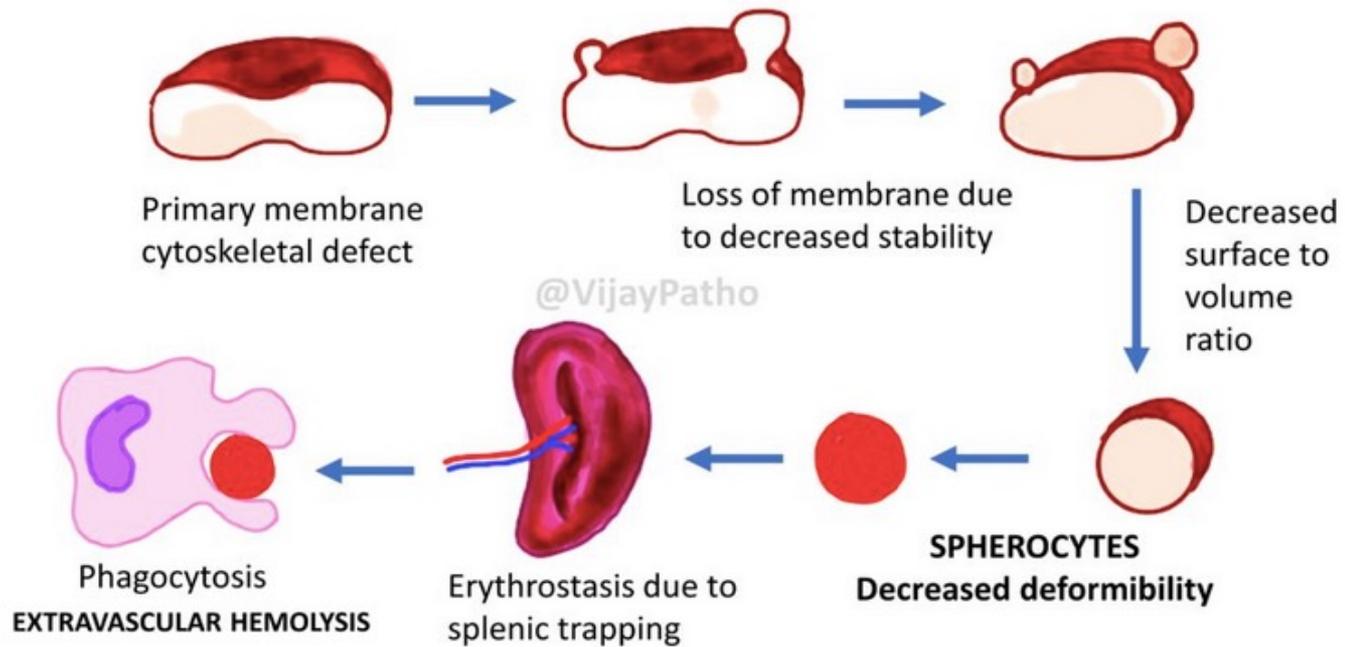
| ANEMIE MEGALOBLASTICHE DA DEFICIT DI VIT B12 E FOLATI |           |                       |
|---|-----------|-----------------------|
|   | EMOCROMO  |                       |
|   | NORMALE   | ANEMIA MEGALOBLASTICA |
| Hb g/dL   | 15.0      | 7.5                   |
| Eritrociti x 10 <sup>6</sup> /μL                      | 5.000.000 | 2.000.000             |
| HCT (%)   | 45        | 25                    |
| MCV (μ <sup>3</sup> )                                 | 90        | 125                   |
| Leucociti x 10 <sup>3</sup> /μL                       | 6000      | Normali o ridotti     |
| Piastrine x 10 <sup>3</sup> /μL                       | 250.000   | Normali o ridotti     |

Istituto "Sergio" Bologna

- Aumenta: casi di emolisi intravascolare (dovuto alla Hb libera e a calo di HCT per lisi dei GR); sferocitosi ereditaria (calo HCT per calo MCV)
- Diminuisce: anemia sideropenica e talassemia
- Rimane uguale o scende: a. megaloblastica



**HERIDETARY SPHEROCYTOSIS- PATHOPHYSIOLOGY**



Mentre l'MCH misura la quantità assoluta di emoglobina per ogni globulo rosso, dando quindi un valore assoluto che però non viene messo in relazione alla dimensione del globulo rosso, l'MCHC misura la concentrazione di emoglobina all'interno del globulo rosso, facendo capire chiaramente, qualsiasi sia la dimensione del globulo rosso, se questo è ricco o povero di emoglobina.

Per fare un esempio, un globulo rosso megaloblastico può avere una quantità di emoglobina normale o addirittura maggiore, ma possiede una grande dimensione e quindi risulterà più pallido.

Mentre con l'MCH la quantità di emoglobina risulterà normale o maggiore, l'MCHC segnalerà che invece la concentrazione di emoglobina nel globulo rosso è bassa.

**Frequentemente nelle anemie** ci sono eritrociti anormali di *dimensioni variabili (ANISOCITOSI)*, da molto piccoli a molto grandi.

Questa variabilità non è evidenziabile quando si calcola la media dei valori.

**Esame morfologico** (striscio di sangue) + **RDW**  
(= ampiezza di distribuzione degli eritrociti)

RDW(Red Cell Distribution Width) 는 RBC 크기의 분포를 나타내는 것이다.

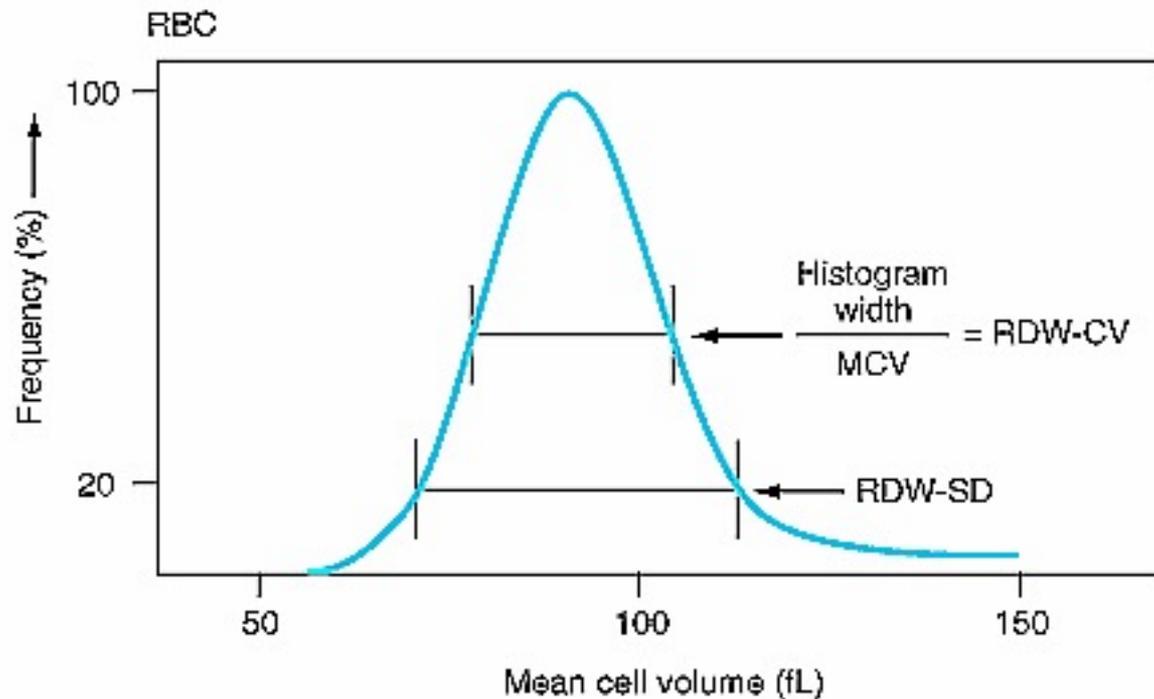
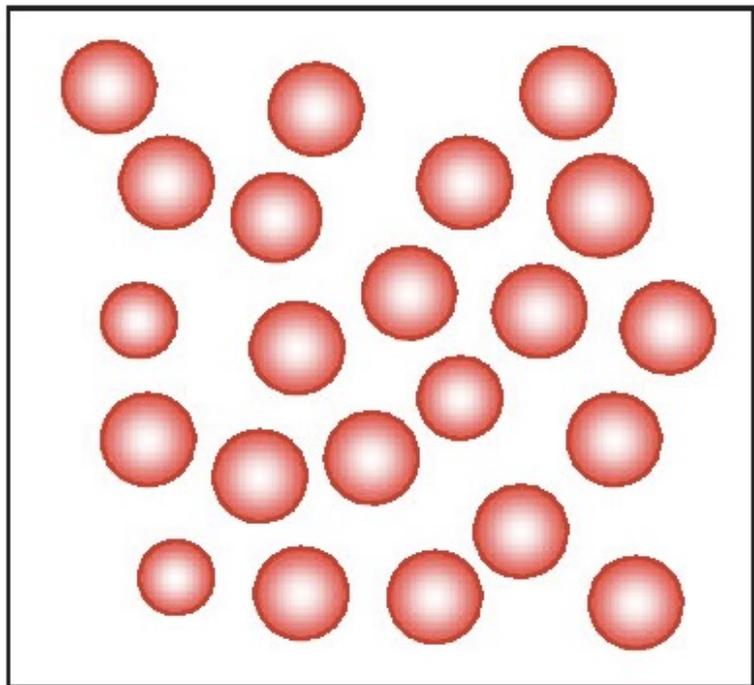


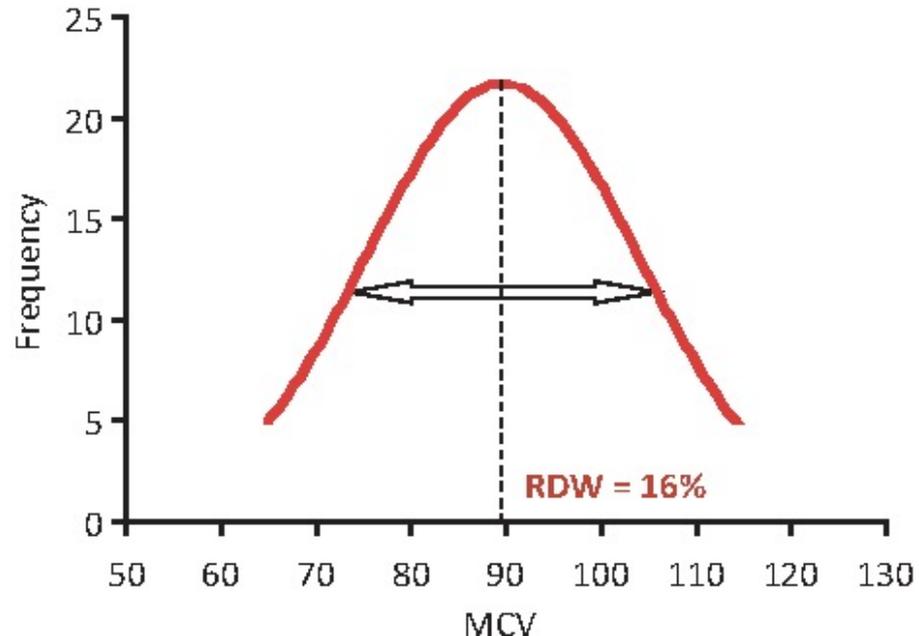
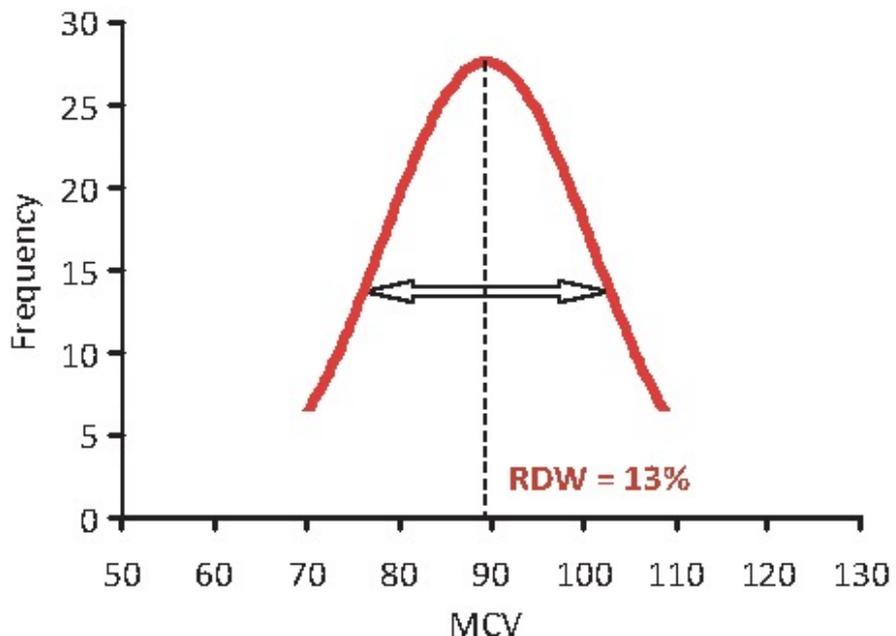
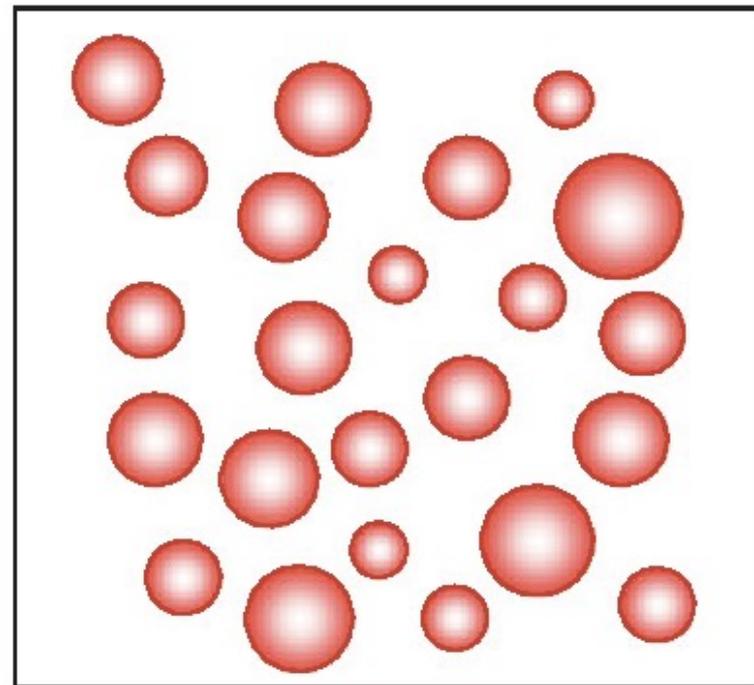
그림 1. Automated cell counters display a distribution curve of the red blood cell volume and calculate two measurements of the width of the distribution curve. The RDW-CV is calculated as a ratio of the width of the curve at 1 standard deviation divided by the MCV. The RDW-SD is simply the width of the curve measured at the 20 percent frequency level (RDW, red cell distribution width).

4. RDW [in genere espresso come coefficiente di variazione o RDW-CV(%)]= si ottiene dividendo l'ampiezza della curva ad 1 deviazione standard per il volume eritrocitario medio e moltiplicando il risultato per 100. Valore in genere compreso fra 11.5% e 14.5%.

**Low Anisocytosis**



**High Anisocytosis**



# CONTA RETICOLOCITARIA

**RETICOLOCITI:** eritrociti immaturi immessi nel circolo dal midollo; **hanno ancora materiale ribonucleoproteico per cui risultano colorati (policromasia)**

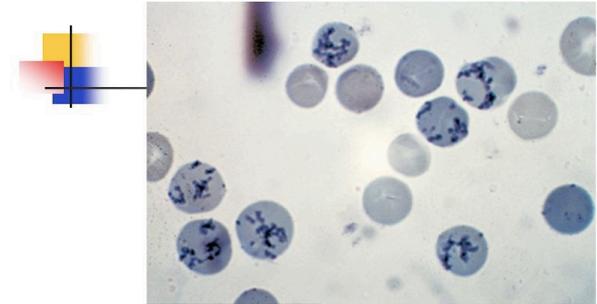
- Valori normali: 0.5-2.5% (sul totale degli eritrociti)

Aumento:

- Anemia emolitica
- Emorragie

Diminuzione:

- Ridotta produzione di eritropoietina (per insuff. renale)
- Occupazione spazio midollare
- Difetti cellula staminale
- Deficit sintesi Hb
- Deficit sintesi DNA



Reticolociti

Methylene blue stain demonstrates residual RNA in newly made red cells  
POLICROMASIA: reticulociti rilasciati precocemente dal midollo

# ERITROPOIESI

Pro-eritroblasto

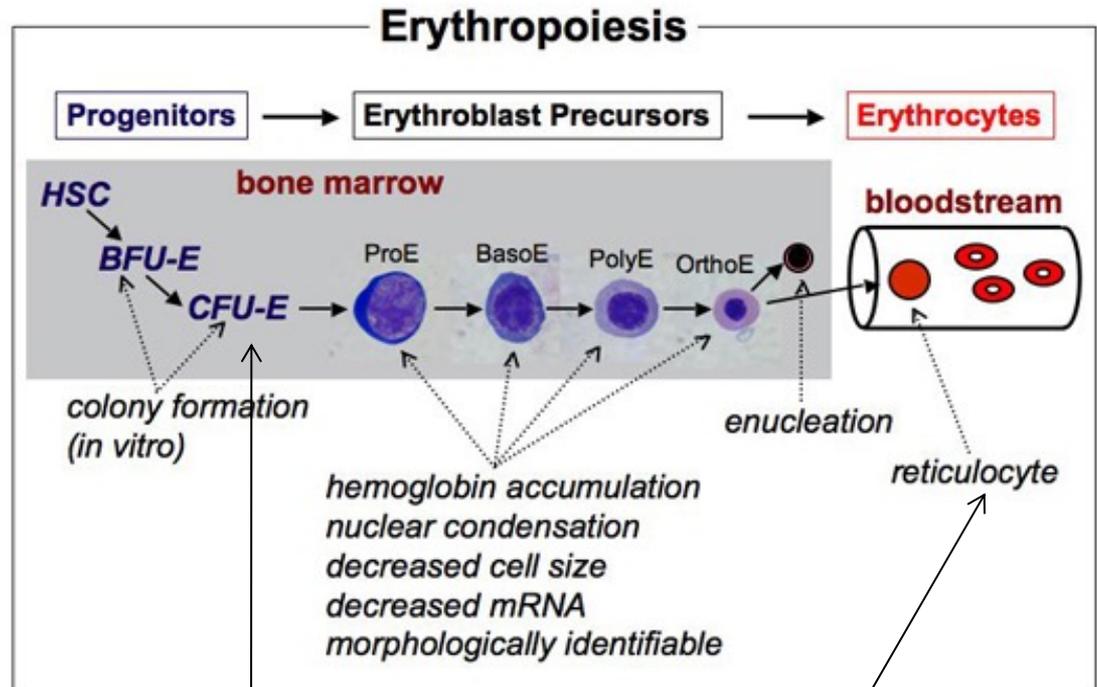
Eritroblasto basofilo

Eritroblasto policromatofilo

Eritroblasto acidofilo

Reticolocito

Eritrocito



*Sensibile all'eritropoietina*

*cellule che in 24-48 ore  
maturano diventando eritrociti  
maturi*

# ERITROPOIETINA (EPO)

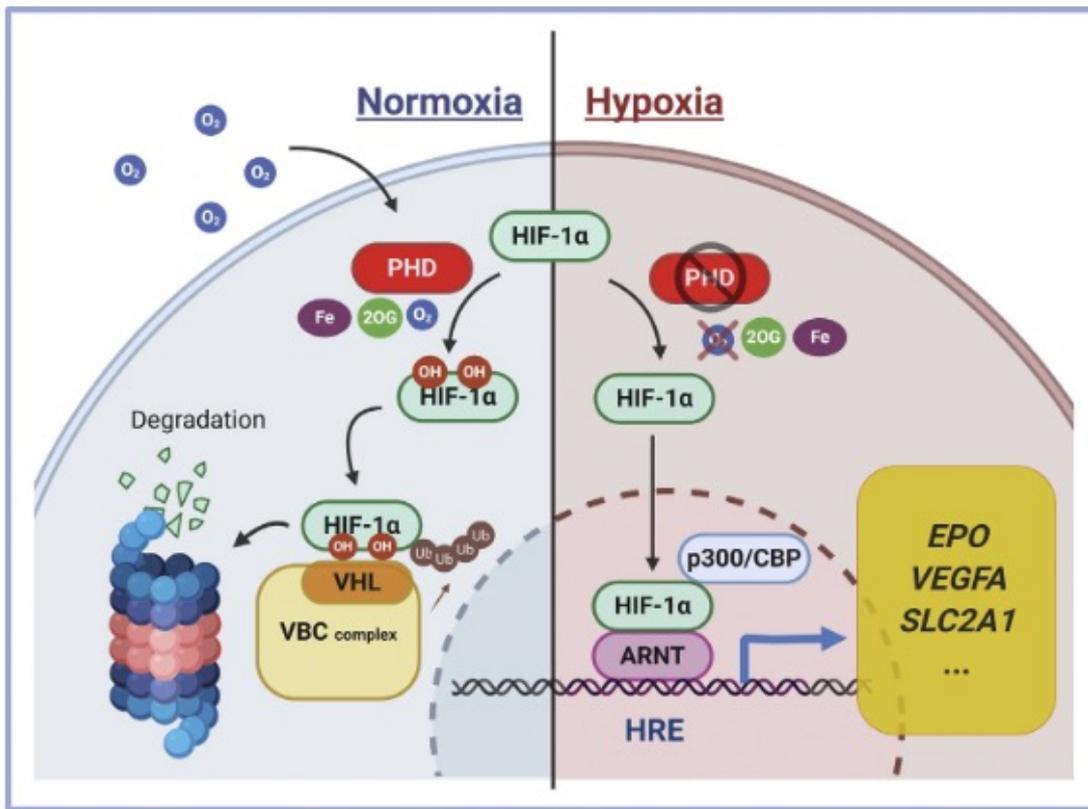
Stimola la velocità di proliferazione e di maturazione dei precursori eritroidi a livello midollare.

La sintesi dell'EPO è controllata da un sistema a feedback molto sensibile a livello del rene.

Le cellule produttrici di EPO e sensori dell'ossigeno sono cellule peritubulari, interstiziali, simili a fibroblasti, situate nella regione cortico-medullare del rene.

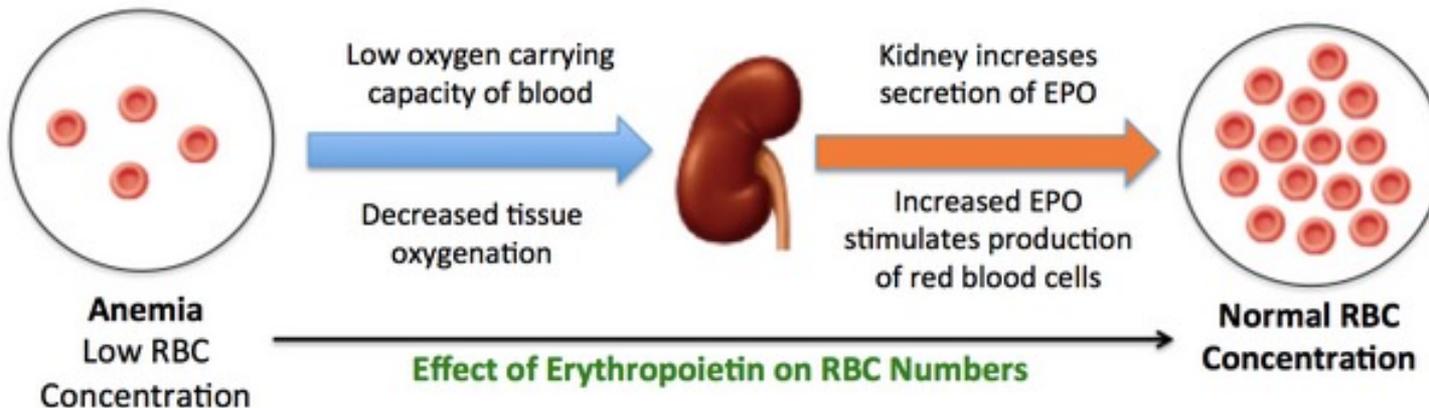
Una volta rilasciato l'ormone nel circolo sistemico, questo va ad agire a livello del midollo osseo emopoietico.

Ipossia tissutale → [eritropoietina] ↑



HIF-1a : hypoxia-inducible Factor  
 PHD: prolyl-hydroxylase enzyme

<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.06.006>



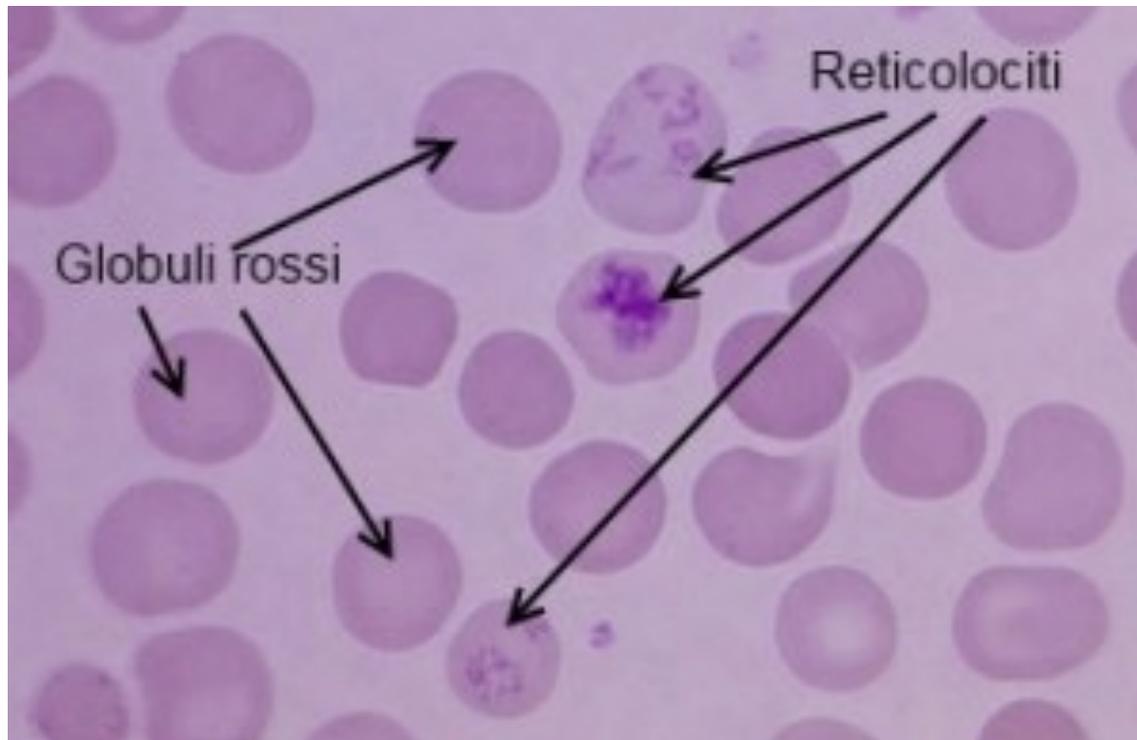
## Condizioni di ipossia tissutale:

- [emoglobina] ↓
- alterata cessione di O<sub>2</sub> dall'Hb
- alterato scambio di O<sub>2</sub> a livello respiratorio
- ↓ flusso sanguigno

La capacità dell'ormone di stimolare l'eritropoiesi dipende da un adeguato rifornimento al midollo di nutrienti, minerali e coenzimi fra cui ferro, acido folico e vitamina B12.

In laboratorio il **conteggio dei reticolociti** viene usato congiuntamente alle altre indagini per la diagnosi di anemia, ma anche per **rivelare l'azione dell'ormone**.

Si valuta in genere concomitantemente alla misurazione della eritropoietina mediante test ELISA.



# MORFOLOGIA ERITROCITI

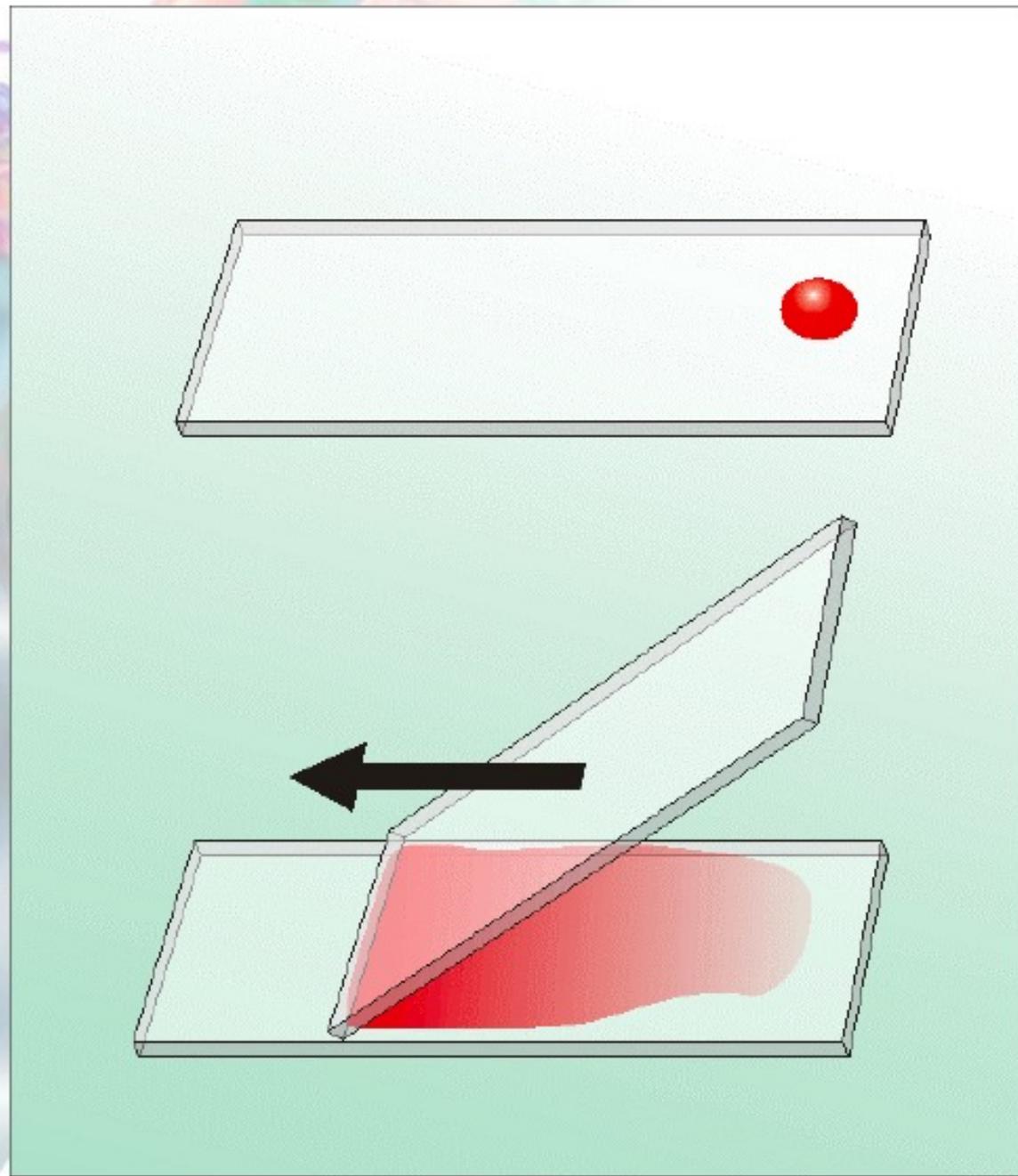
Dall'esame di uno **striscio di sangue** periferico colorato secondo Wright-Giemsa si possono ottenere molte informazioni utili per la diagnosi. Si possono osservare:

- variazioni del colore dei GR (es. **ipocromia o policromasia**)
- variazioni di dimensioni (**anisocitosi, micro- o macrocitosi**)
- forme bizzarre (**poichilocitosi**)

# LO “STRISCIO” DI SANGUE

Gli elementi figurati del sangue vengono fissati e poi colorati con una miscela di coloranti acidi, basici e neutri

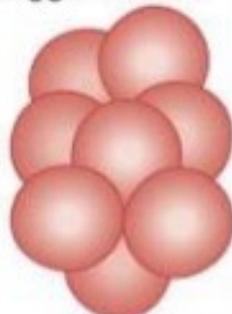
nello striscio di sangue la matrice extracellulare (plasma) viene eliminata e si osservano solo i cosiddetti elementi figurati, ovvero cellule o parti di cellule



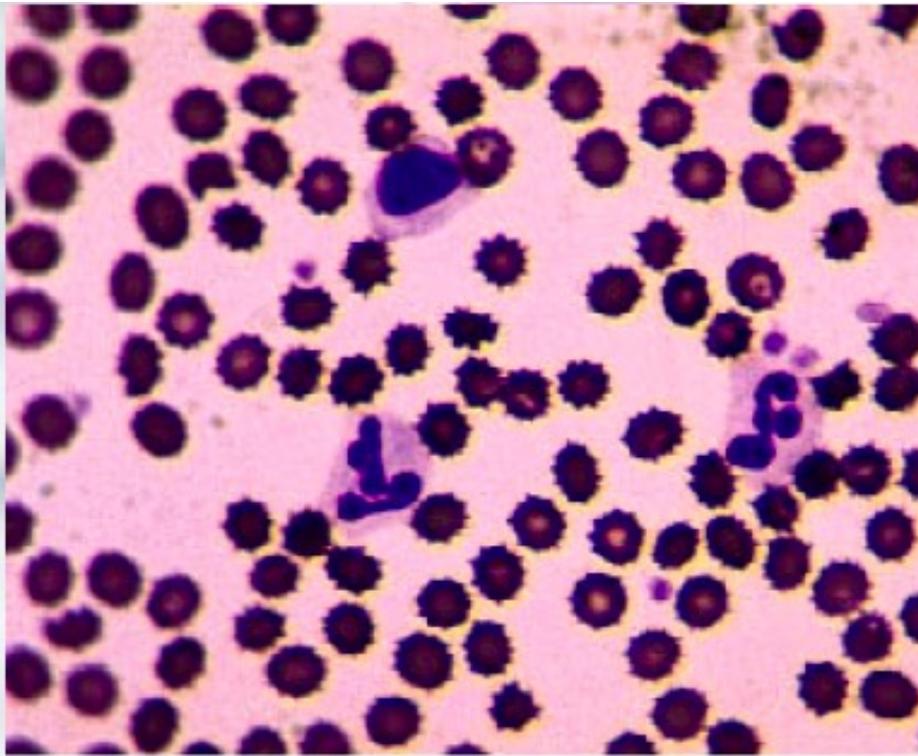
|                         | Osservazione   | Significato  |
|-------------------------|--|--|
| <b>MACROCITOSI</b>      | Diametro cellulare >8 µm<br>MCV >100 fl  | Anemie megaloblastiche<br>Epatopatie gravi<br>Ipotiroidismo  |
| <b>MICROCITOSI</b>      | Diametro cellulare <6 µm<br>MCV <80 fl<br>MCHC <27%  | Anemia sideropenica<br>Talassemie<br>Anemia da malattie croniche   |
| <b>IPOCROMIA</b>        | Area pallida centrale aumentata  | Contenuto emoglobinico diminuito   |
| <b>POLICROMATOFILIA</b> | Presenza di globuli rossi non completamente emoglobinizzati                                      | Reticolocitosi   |
| <b>POICHILOCITOSI</b>   | Variabilità della forma cellulare  | Anemia a cellule falciformi<br>Emolisi microangiopatica<br>Leucemie<br>Emopoiesi extramidollare<br>Stress midollare da qualsiasi causa<br>Reticolocitosi   |
| <b>ANISOCITOSI</b>      | Variabilità delle dimensioni cellulari   | Trasfusione di sangue normale in presenza di popolazioni cellulari microcitiche o macrocitiche   |
| <b>LEPTOCITOSI</b>      | Cellule ipocromiche in cui l'emoglobina occupa una piccola zona centrale ("cellule a bersaglio") | Talassemie<br>Ittero ostruttivo  |
| <b>SFEROCITOSI</b>      | Cellule prive dell'area pallida centrale, perdita della forma a disco biconcavo<br>MCHC elevata  | Perdita di membrana<br>Sferocitosi ereditaria<br>Accelerata distruzione di globuli rossi da parte del sistema reticolo-endoteliale   |
| <b>SCHISTOCITOSI</b>    | Presenza di frammenti cellulari in circolo   | Aumento dei traumi meccanici intravascolari<br>Emolisi microangiopatica  |
| <b>ACANTOCITOSI</b>     | Superficie irregolarmente spinosa  | Contenuto lipidico di membrana irreversibilmente alterato<br>Epatopatie<br>Abetalipoproteinemia  |
| <b>ECHINOCITOSI</b>     | Superficie regolarmente spinosa  | Alterazioni reversibili dei lipidi di membrana<br>Elevate concentrazioni di acidi grassi liberi plasmatici<br>Alterazioni degli acidi biliari<br>Effetti di farmaci (barbiturici, salicilati ecc.) |
| <b>STOMATOCITOSI</b>    | Area pallida centrale allungata, a fessura   | Difetti ereditari nel trasporto di membrana del sodio<br>Gravi epatopatie  |
| <b>ELLISSOCITOSI</b>    | Cellule ovali  | Anomalia ereditaria, generalmente asintomatica   |

**ALTERAZIONI  
MORFOLOGICHE DEI GR  
OSSERVABILI SU UNO  
STRISCIO COLORATO  
DI SANGUE PERIFERICO**

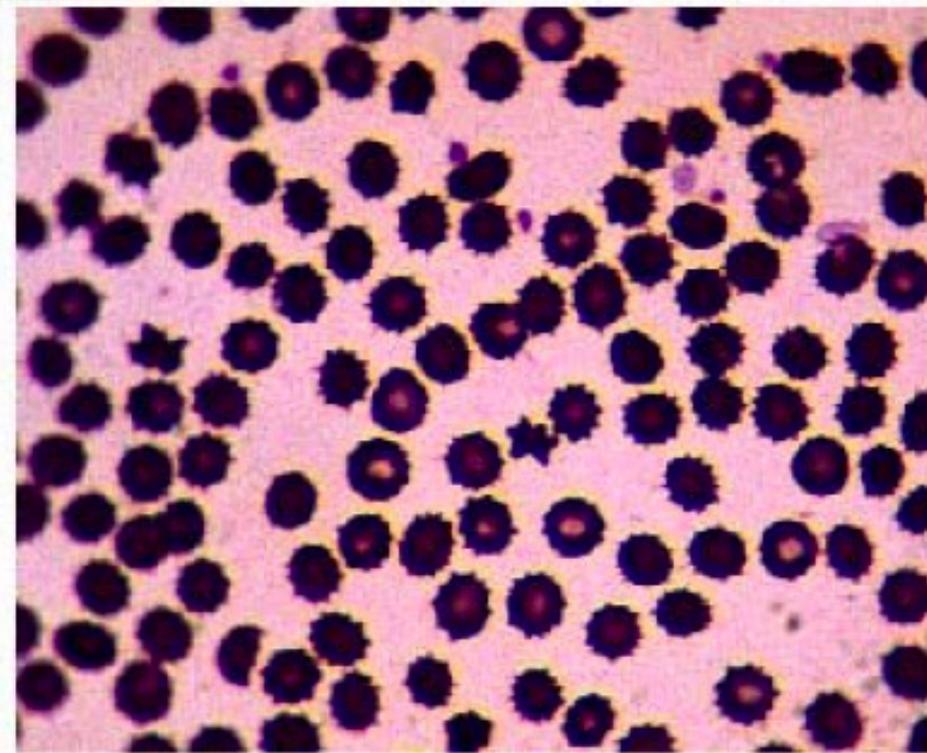
## RED BLOOD CELL MORPHOLOGY

| Size variation   | Hemoglobin distribution   | Shape variation  |   | Inclusions  | Red cell distribution  |
|--|---|--|---|---|--|
| Normal<br>                  | Hypochromia 1+<br>                 | Target cell<br>   | Acanthocyte<br>                   | Pappenheimer bodies (siderotic granules)<br> | Agglutination<br> |
| Microcyte<br>               | 2+<br>                             | Spherocyte<br>    | Helmet cell (fragmented cell)<br> | Cabot's ring<br>                             | Rouleaux<br>     |
| Macrocyte<br>               | 3+<br>                             | Ovalocyte<br>     | Schistocyte (fragmented cell)<br> | Basophilic stippling (coarse)<br>            |  |
| Oval macrocyte<br>         | 4+<br>                            | Stomatocyte<br>  | Tear drop<br>                    | Howell-Jolly<br>                            |  |
| Hypochromic macrocyte<br> | Polychromasia (Reticulocyte)<br> | Sickle cell<br> | Burr cell<br>                   | <b>Crystal formation</b>  |  |
|  |   |  |   | HbSC<br>                                   | HbC<br>         |

## ECHINOCITI



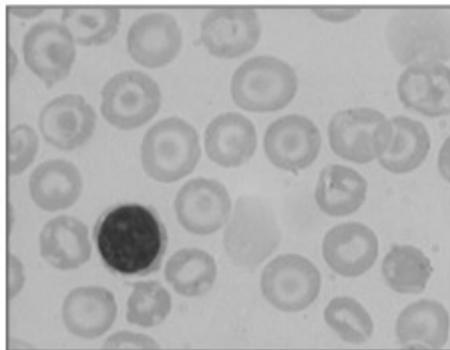
**Fig. 2**  
*Echinociti, caratterizzati dalle spicolature membranarie, due neutrofilii ed un linfocita (Hemacolor®; ingr.: 100X)*



**Fig.3**  
*Tra gli echinociti si osserva centralmente un unico acantocita, riconoscibile per le divitazioni della membrana (He-*

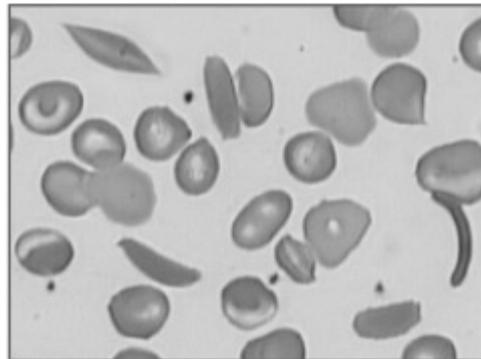
## ACANTOCITI

Cellule a bersaglio



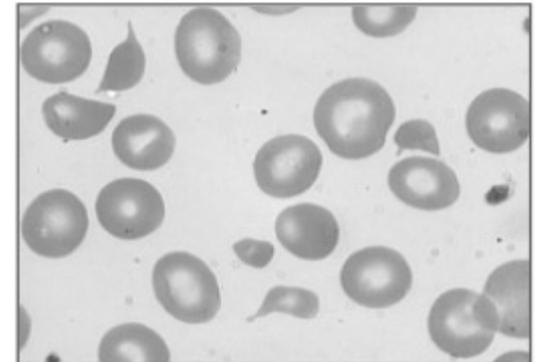
Leptocitosi  
(c. ipocromiche,  
es: talassemia)

Cellule falciformi



Poichilocitosi  
(es: anemia falciforme)

Schistociti



Schistocitosi  
(emolisi)

i) ANEMIE DA ALTERATA PRODUZIONE ERITROCITARIA

- **anemie carenziali** (es: carenza ferro, di Vit. B12 e folati)
- midollo emopoietico funzionante ridotto o assente (aplasia midollare da farmaci, radiazioni; infiltrazione neoplastica del midollo osseo)
- sintesi Hb anomala o ridotta (es:  $\beta$ -talassemia)

ii) ANEMIE DA PERDITA ECCESSIVA DI ERITROCITI

- emorragia
- emolisi (es. anemia falciforme e  $\alpha$ -talassemia)

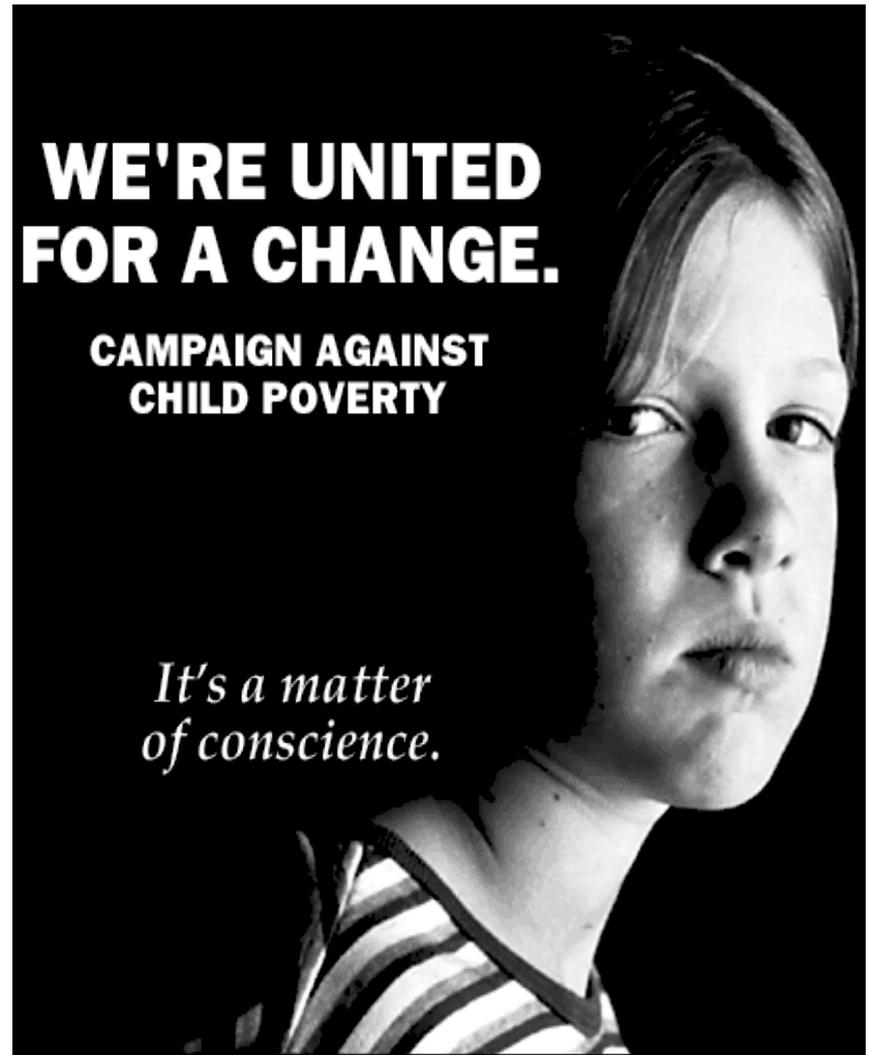
### ANEMIE CARENZIALI:

i) La **carenza di ferro** è la causa + frequente di anemia. Può essere dovuta a:

- perdite di sangue
- aumentate richieste di ferro
- deficienze nutrizionali
- malassorbimento

# Anemie Ferro-carenziali

- La carenza di ferro è la principale forma di malnutrizione nel mondo
- Colpisce circa 1.5 miliardi di persone
- La carenza di ferro è pericolosa soprattutto per le donne in età fertile e per i bambini, per le sue gravi conseguenze sulla salute e sulla capacità di apprendimento



## Cause non patologiche

Alimentazione errata o insufficiente

Farmaci (FANS)

Età: primi anni di vita

Gravidanza

Allattamento

Mestruazioni abbondanti

## Cause patologiche

Cancro al colon

Celiachia

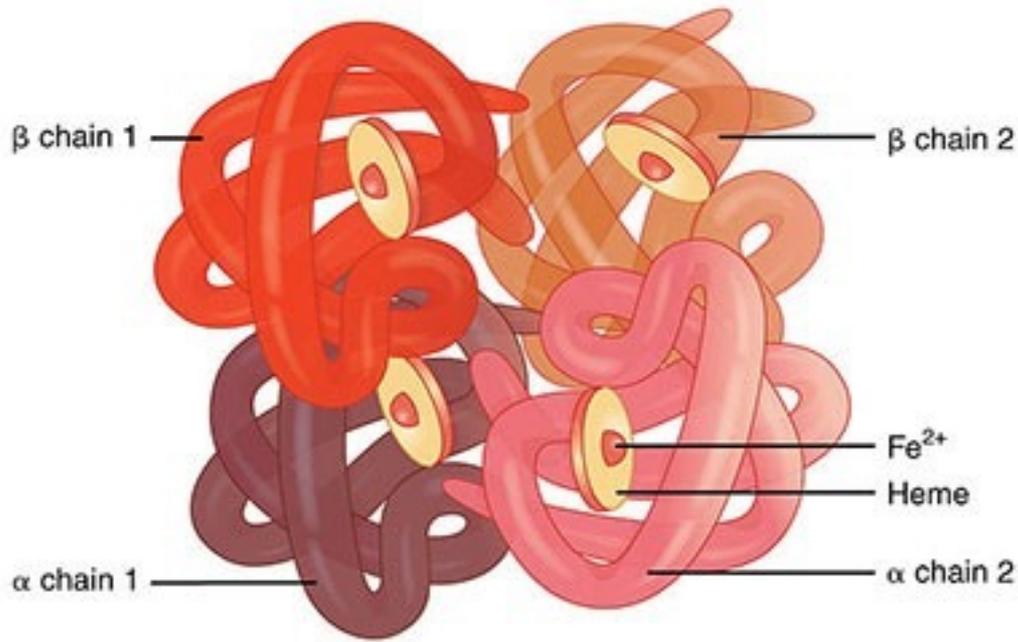
Morbo di Crohn

Colite ulcerosa

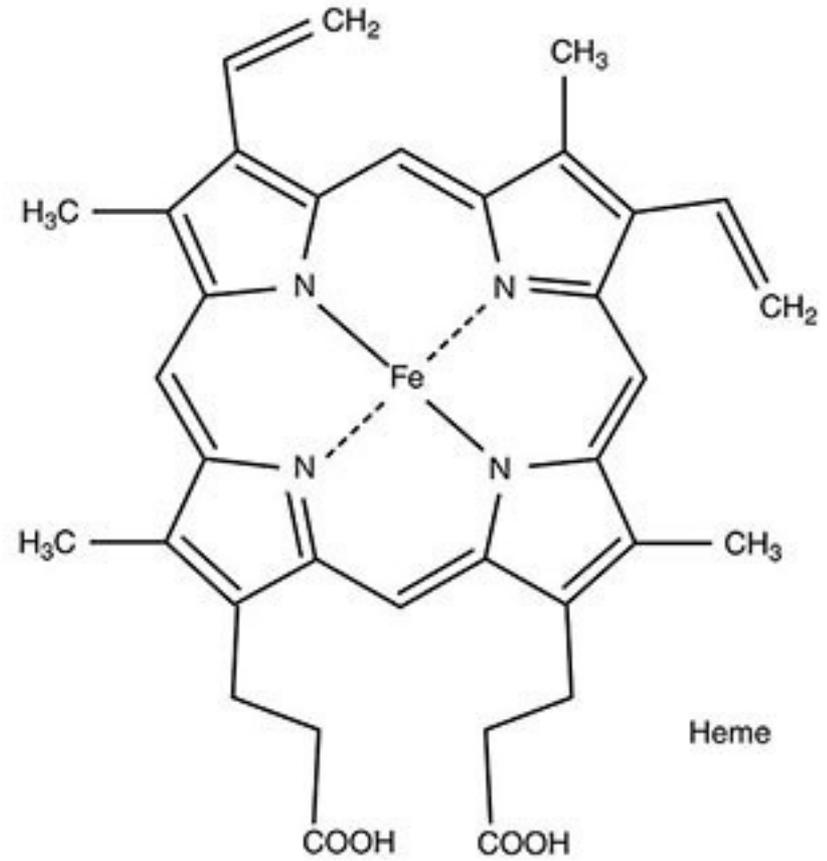
Infiammazioni dell'apparato gastrointestinale

Alcune cause  
della  
**anemia**  
**sideropenica**

**GRUPPO EME= struttura porfirinica con al  
centro un atomo di Fe**



(a)



(b)

# CICLO DEL FERRO

Il ferro è l'oligoelemento + abbondante nell'organismo umano (60 mg/kg nell'uomo e 50 mg/kg nella donna). Di questo:

-il 65% si trova nell'emoglobina.

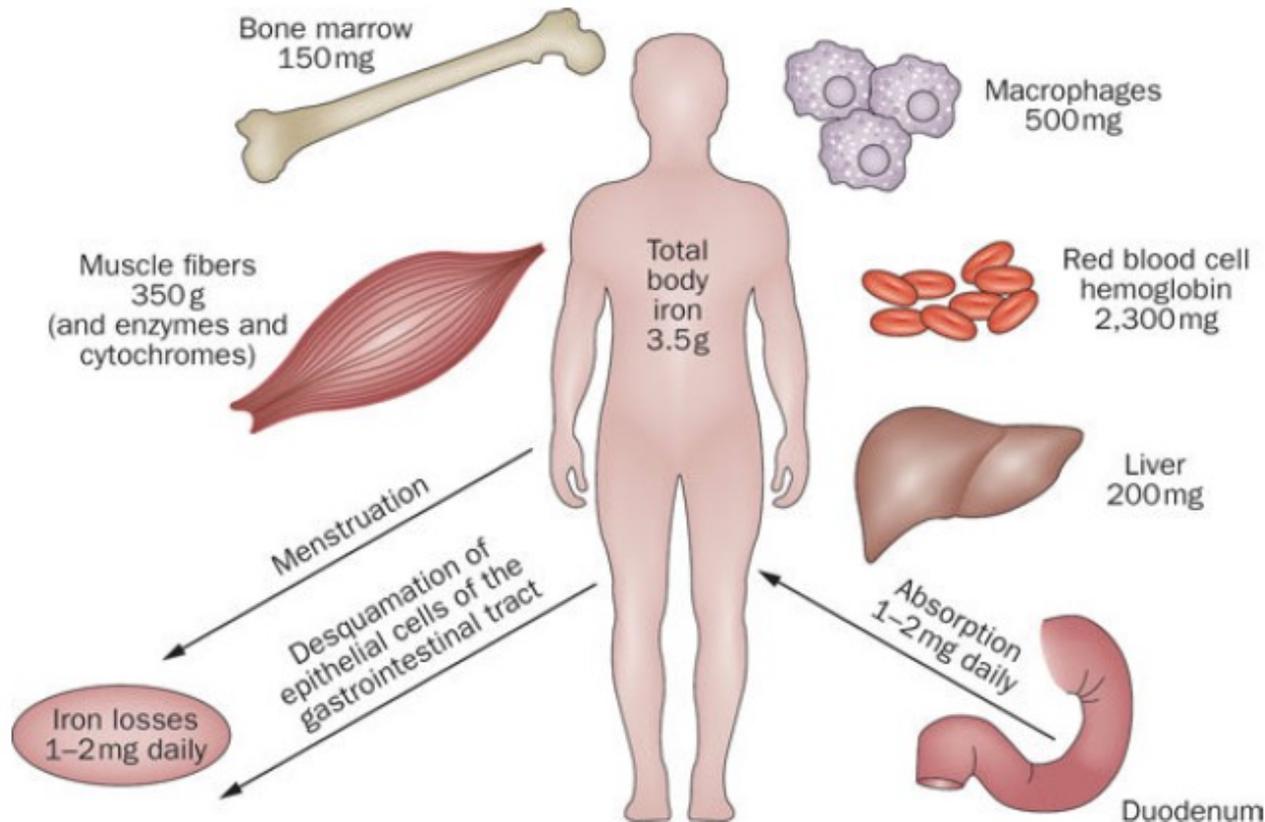
-il 10% nella mioglobina e citocromi.

-la restante quota è depositata a livello di **fegato, milza e midollo osseo (ferritina o emosiderina)**.

Per ogni ml di sangue prodotto è necessario 1 mg ferro.

Ogni giorno l'eritropoiesi richiede 20-25 mg di ferro; **per il 95% il ferro è riciclato**. Piccole perdite dovute all'escrezione urinaria e fecale → è necessario che l'organismo assorba 1 mg ferro/giorno.

Il **ferro** è un oligoelemento essenziale per l'uomo essendo parte della struttura dell'eme, il componente non proteico di numerose ferroproteine (e.g. emoglobina, mioglobina, citocromi).



Assorbimento ferro a livello intestinale.

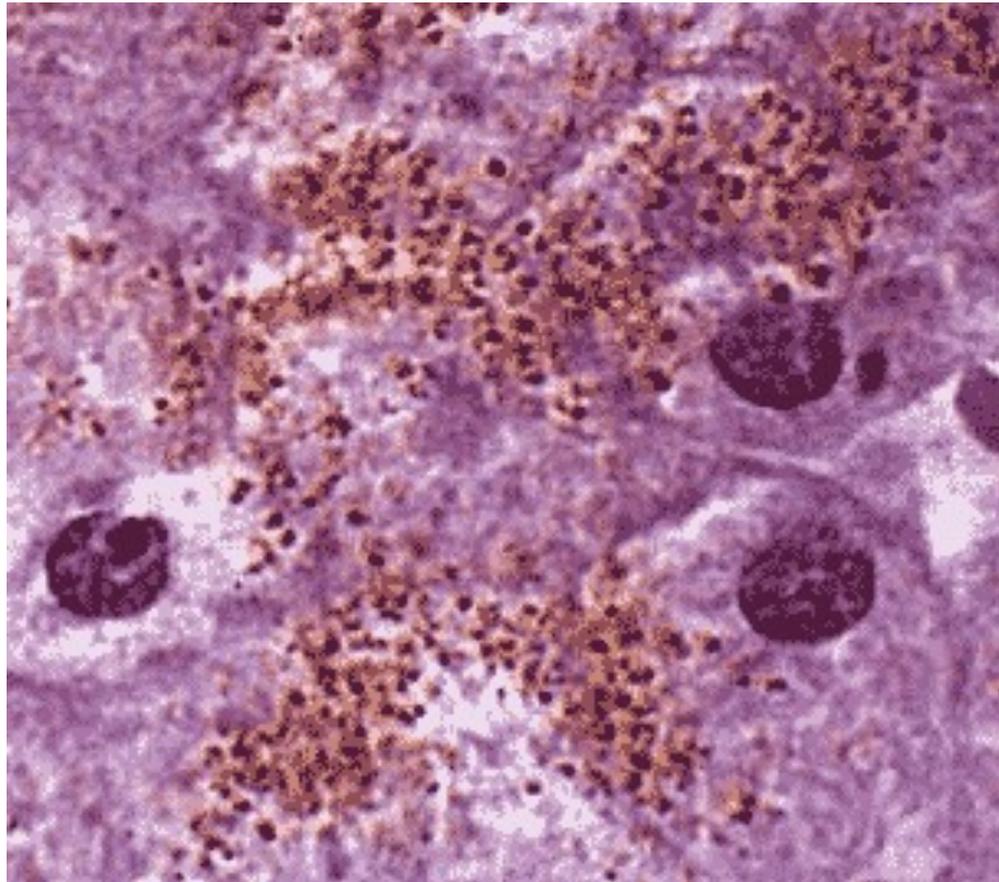
Nel **sangue** il ferro è legato alla **transferrina**, una  $\beta$ -globulina che lo porta al midollo osseo dove viene utilizzato per essere incorporato nell'emoglobina.

Il 10-20% circa del ferro totale è sotto forma di deposito (legato alla **ferritina**). Se è assorbito in eccesso rispetto alla capacità di legame della ferritina si deposita sulle membrane lisosomiali dei macrofagi in forma di complesso pseudocristallino (legato alla **emosiderina**).

La **ferritina** è presente in quasi tutti i tessuti ma prevalentemente nel **fegato, milza e midollo osseo**.

La **emosiderina** è presente **nei macrofagi del fegato e del midollo osseo**. Meno facile metabolizzare il ferro legato ad essa.

**Emosiderina**, costituita dal prodotto della condensazione di molecole di ferritina, proteine, lipidi, acido sialico e porfirine, è difficilmente aggredibile dagli enzimi proteolitici.



**Emosiderina accumulata nei macrofagi**

## VALORI NORMALI DEI PARAMETRI RELATIVI AL METABOLISMO DEL FERRO

Ferro (Fe) sierico legato alla transferrina (**SIDEREMIA**): 50-150 mg/dl

Capacità totale di legare il ferro della transferrina (**TIBC**): 240-360 mg/dl (1)

**Percentuale di saturazione transferrina** (sideremia $\times$ 100/TIBC): 20-45%

**Ferritina sierica**: 12-300 mg/l (2)

**Protoporfirina eritrocitaria libera**: 15-18 mg/dl (3)

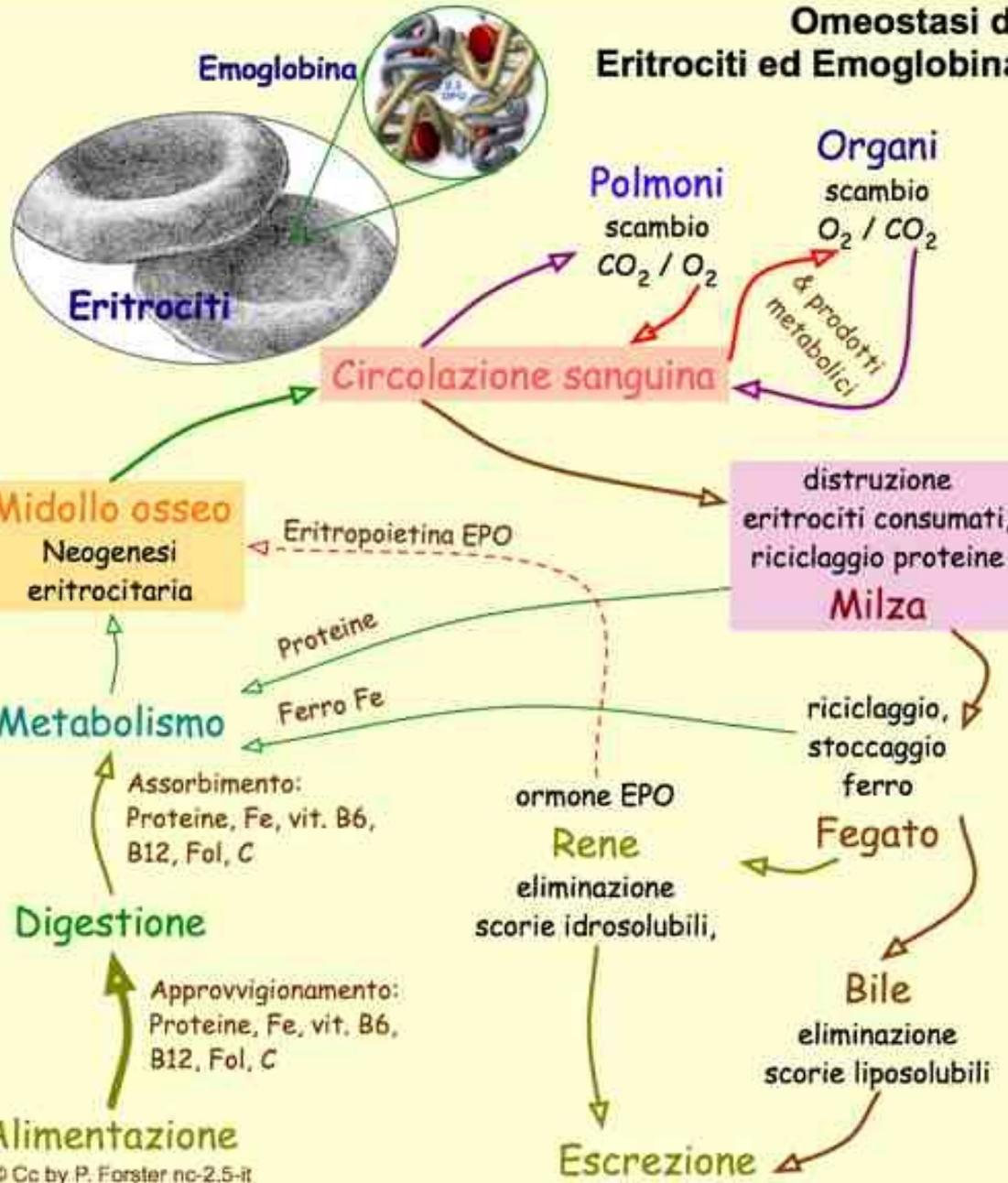
(1) In carenza di ferro, cala la sideremia e sale la TIBC perché si ha una maggior percentuale di transferrina insatura

(2) La concentrazione di ferritina nel sangue (ferritina sierica) rispecchia l'entità delle riserve corporee di ferro.

(3) La protoporfirina è una molecola presente nella fase finale della sintesi del gruppo eme. Per il passaggio da protoporfirina a eme, si necessita di ferro; se questo non è presente non si ha la conversione e il valore delle protoporfirina aumenta

La valutazione della protoporfirina eritrocitaria libera è un esame importante per identificare l'anemia sideropenica.

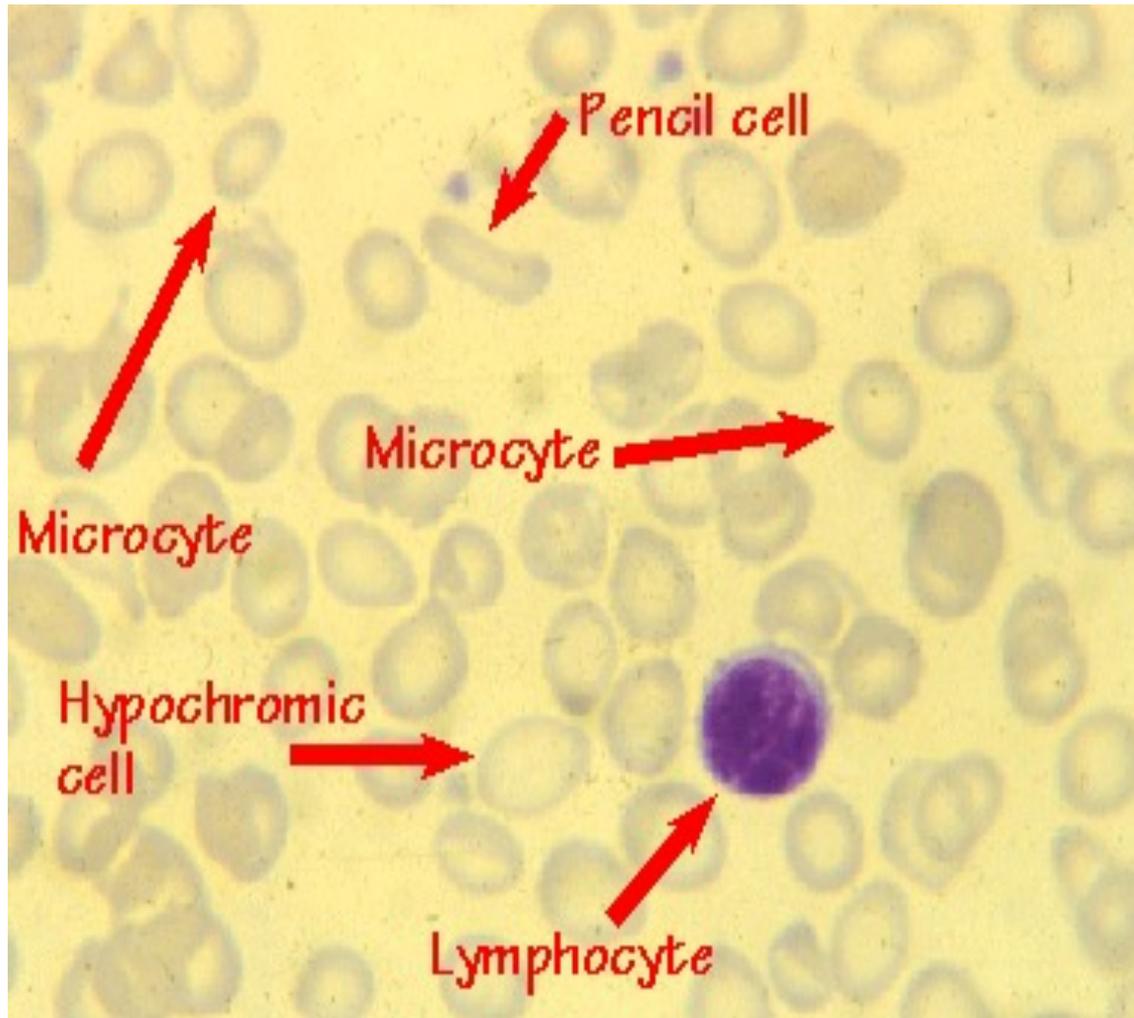
# Omeostasi di Eritrociti ed Emoglobina



|   | Normale | Deplezione di ferro | Eritropoiesi in carenza di ferro | Anemia da carenza di ferro |
|---|---------|---------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Depositi di ferro →                                   |         |                     |                                  |                            |
| Ferro dell'eritrone →                                 |         |                     |                                  |                            |
| Ferro di deposito midollare                           | 2 - 3 + | 0 - 1 +             | 0                                | 0                          |
| TIBC (µg/dl)  | 330 ±30 | 360                 | 390                              | 410                        |
| Ferritina sierica (µg/ml)                             | 100 ±60 | 20                  | 10                               | <10                        |
| Assorbimento del ferro (%)                            | 5 - 10  | 10 - 15             | 10 - 20                          | 10 - 20                    |
| Sideremia (µg/dl)                                     | 115 ±50 | 115                 | <60                              | <40                        |
| Saturazione della transferrina (%)                    | 35 ±15  | 30                  | <15                              | <10                        |
| Sideroblasti  | 40 - 60 | 40 - 60             | <10                              | <10                        |
| Protoporfirina Eritrocitaria (µg/dl di globuli rossi) | 30      | 30                  | 100                              | 200                        |
| Eritrociti  | Normali | Normali             | Normali                          | Microciti ipocromici       |

**Figura 3.1** Sequenza dei cambiamenti osservabili durante l'instaurarsi di una carenza di ferro. Si può evidenziare una diminuzione dei depositi di ferro valutando al microscopio la quantità di ferro immagazzinata nel sistema reticolo-endoteliale del midollo osseo, la capacità totale di legare il ferro (TIBC), i livelli di ferritina nel siero e la percentuale di ferro assorbito dopo un test di somministrazione orale di ferro. Una volta esauriti i depositi di ferro, i parametri indicativi dello stato del ferro, la sideremia, la saturazione della transferrina, il numero di sideroblasti midollari e la protoporfirina eritrocitaria cominciano ad alterarsi, l'eritropoiesi diventa meno efficiente e compare l'anemia. Se la condizione persiste, gli eritrociti diventano microciticici e ipocromici. (Da Hillman R.S., Finch C.A.: Red Cell Manual, 7ª ed., F.A. Davis Filadelfia, 1996, pag. 72, riproduzione autorizzata).

# Striscio di sangue periferico di un paziente affetto da anemia ferro-carenziale



ii) Anemie da **deficienza di vitamina B12 ed acido folico** (anemie megaloblastiche)\*.

Eritropoiesi inefficace. Midollo ricchissimo in eritroblasti che non riescono a maturare e più grandi.

-Carenza vit. B12 in genere per **malassorbimento**; es. **anemia perniciosa** causata dalla mancanza del *fattore intrinseco* (cofattore essenziale all'assorbimento della vit. B12 a livello intestinale; la sua non produzione da parte delle cellule parietali gastriche è legata a fenomeni autoimmuni).

-**Deficit di acido folico** quasi sempre per **dieta inadeguata** o richieste aumentate (gravidanza, allattamento, adolescenza)

Deficienza vit. B12 ed ac. folico → **alterata sintesi DNA** (colpisce tessuti altamente proliferanti come il midollo)

\*il numero dei globuli rossi è diminuito, ma il loro volume è elevato perciò l'ematocrito può scendere ma non necessariamente.

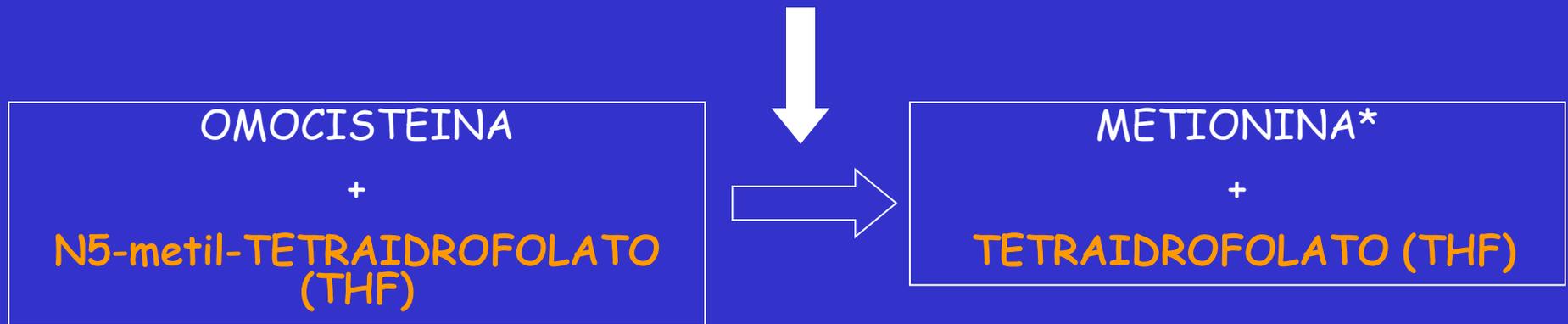
I megaloblasti sono **eritroblasti** (i precursori degli eritrociti) **di dimensioni maggiori** rispetto al normale con conseguente diminuzione del rapporto tra volume del nucleo e volume del citoplasma.

La megaloblastosi esprime un'alterazione nella maturazione cellulare dovuta ad una biosintesi insufficiente di DNA, per cui la cellula si accresce senza però dividersi.

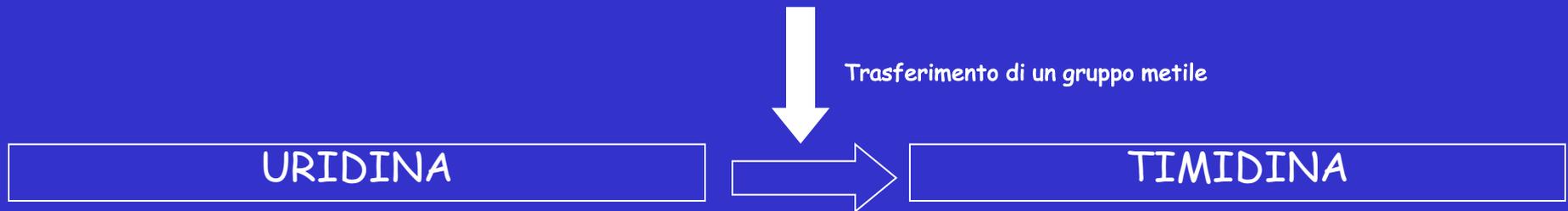
# ANEMIE MEGALOBLASTICHE DA DEFICIT DI VIT B12

- **Vit B12:**

- **Co-enzima della METIONINA SINTETASI**



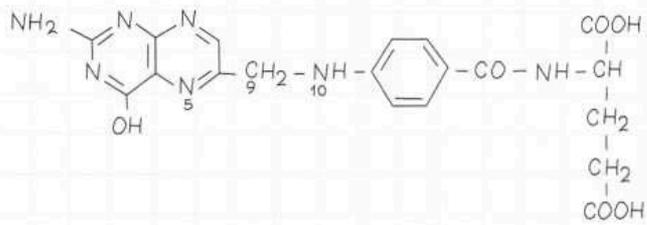
- **N5, N10 metilen THF: Co-enzima della TIMIDILATOSINTETASI**



\*La **metionina** è un donatore di metili

**Nucleoside  
pirimidinico**

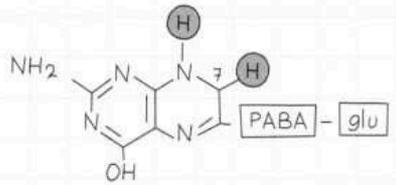
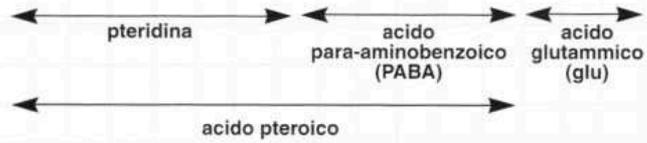




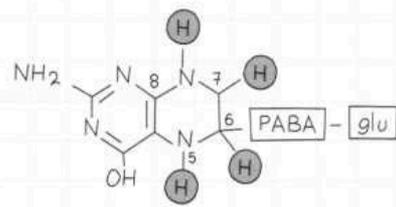
acido folico

**FORMA OSSIDATA**  
**MOLTO RARA IN NATURA**  
**STABILE AL CALORE**  
**BIODISPONIBILITA MOLTO ALTA (85%)**

IN SUPPLEMENTI E ALIMENTI FORTIFICATI

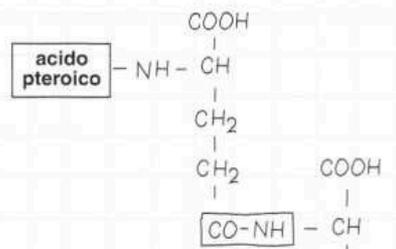


acido diidrofolico



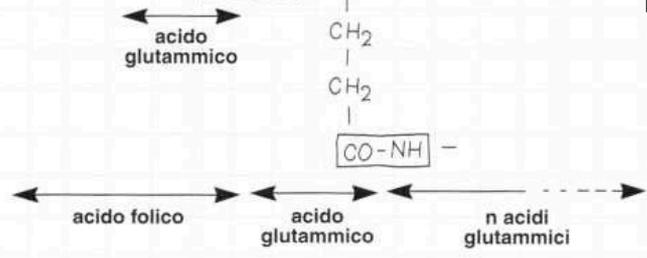
acido tetraidrofolico

**Forme biologicamente attive**



poligluttammati

**Presenti negli alimenti (indicati come FOLATI)**



# Anemia megaloblastica

## Definizione:

- **Alterazione** nella **sintesi** del **DNA**, per cui la cellula si accresce senza però dividersi. Effetti sia su linea mieloide che eritroide: emazie macrocitarie e diversi gradi di pancitopenia
- Coinvolge anche altre cellule con rapido turnover (cellule gastro-intestinali)
- E' data dalla **carenza di folati e vitamina B<sub>12</sub>**

## ANEMIE MEGALOBLASTICHE DA DEFICIT DI VIT B12 E FOLATI

### EMOCROMO

|                                       | <b>NORMALE</b>   | <b>ANEMIA MEGALOBLASTICA</b> |
|---------------------------------------|------------------|------------------------------|
| <b>Hb g/dL</b>                        | <b>15.0</b>      | <b>7.5</b>                   |
| <b>Eritrociti x 10<sup>6</sup>/μL</b> | <b>5.000.000</b> | <b>2.000.000</b>             |
| <b>HCT (%)</b>                        | <b>45</b>        | <b>25 *</b>                  |
| <b>MCV (μ<sup>3</sup>)</b>            | <b>90</b>        | <b>125</b>                   |
| <b>Leucociti x 10<sup>3</sup>/μL</b>  | <b>6000</b>      | <b>Normali o ridotti</b>     |
| <b>Piastrine x 10<sup>3</sup>/μL</b>  | <b>250.000</b>   | <b>Normali o ridotti</b>     |

\*HCT (ematocrito) = non necessariamente scende

MCHC= uguale (se scende anche ematocrito) o più basso (se ematocrito non cambia)

Reticolociti bassi

RDW alto, MCH uguale o più alto (i GR sono più grandi e quindi più ricchi di Hb)

# LA FUNZIONE DELLA VIT B12 e' STRETTAMENTE CORRELATA ALLA FUNZIONE DEL FOLATO

Manifestazioni cliniche di carenza di folato e di B12 sono simili

## TRAPPOLA DEL FOLATO

**CARENZA SECONDARIA DI FOLATI IN PRESENZA DI  
CARENZA DI VITAMINA B12**

**N<sup>5</sup>-metilTHF** deve essere convertito nella forma **THF** dall'enzima metionina sintasi per poter essere riutilizzato.

I folati hanno una biodisponibilità molto minore (del 50%) rispetto all'acido folico oltre ad essere anche molto termolabili (oltre il 50% dei folati vengono persi in cottura).

## **TRAPPOLA DEI FOLATI**

**La carenza di vitamina B12 induce carenza secondaria di folati, che restano bloccati nella forma N5-metilTHF e non sono riportati alla forma funzionale THF.**

I folati si trovano in abbondanza in alcuni alimenti come le verdure a foglia verde (spinaci, broccoli, asparagi, lattuga), le arance, i legumi, i cereali, frutta come limoni, kiwi e fragole e nel fegato. **Il processo di cottura però distrugge la grande maggioranza di folato presente nei cibi.**

La vitamina B12 si trova in fegato, rognone, carne, pesce, crostacei, frutti di mare, pollame, latte, uova.

## **Il Vegetariano non mangia questo**



## **il Vegano non mangia neanche questo**



**Tabella 1 – MODELLI ALIMENTAZIONE VEGETARIANA PIU' SEGUITI**

| <b>TIPO DI DIETA</b>         | <b>NATURA DELLA DIETA<br/>(tutte senza carne e pesce)</b>  |
|------------------------------|--|
| <b>VEGETARIANA</b>           | Nel linguaggio comune si utilizza il termine "vegetariana" per intendere la "latto-ovo-vegetariana". Può includere o meno uova e latticini                                   |
| <b>LATTO-OVO-VEGETARIANA</b> | Include uova, latte e derivati   |
| <b>LATTO-VEGETARIANA</b>     | Include i latte e latticini, ma non le uova.   |
| <b>OVO-VEGETARIANA</b>       | Include le uova e i loro derivati, ma non i latticini.   |
| <b>VEGANA</b>                | Esclude le uova, i latticini e il miele  |
| <b>VEGANA CRUDISTA</b>       | Si basa sul consumo di verdure, frutta, frutta secca e semi oleaginosi, legumi e cereali germogliati. La percentuale di alimenti consumati crudi può variare dal 75% al 100% |

## **IPEROMOCISTEINEMIA**

determinata da cause genetiche o nutrizionali

### **fattore di rischio per**

#### ➤ **patologie cardiovascolari**

(indipendente da ipercolesterolemia o ipertensione)

#### ➤ **esito infausto per gravidanza**

##### **alterazione di sviluppo fetale e neonatale**

(alterata vascolarizzazione della placenta e quindi diminuita funzionalità: aborto, sottopeso neonatale, difetti tubo neurale\*,)

#### ➤ **sindrome di Alzheimer e altri disturbi neurologici**

### **Ruolo della dieta nella prevenzione o nel contenimento del danno**

\*la omocisteina ad alti livelli potrebbe essere neurotossica funzionando da antagonista per il recettore del glutammato, coinvolto nello sviluppo neuronale

# Emopatie maligne

I criteri classificativi delle emopatie maligne sono:

## 1) andamento clinico:

**Leucemie acute** : rapidità di insorgenza dei sintomi e della progressione della malattia che, se non curata, può condurre a morte in breve tempo

**Leucemie croniche**: decorso in genere molto meno tumultuoso

## 2) affiliazione di linea cellulare

Linea linfoide B o T

Linea mieloide

## 3) sito primario di localizzazione:

**Leucemia**: origina nel midollo emopoietico e invade il sangue periferico

**Linfoma**: origina nei linfonodi e tende a formare più “massa neoplastica” localmente, che diffondere nel sangue periferico dando iperleucocitosi

# LEUCEMIE

ORIGINANO DA ESPANSIONE CLONALE DI CELLULE STAMINALI NON ANCORA ORIENTATE O DI PROGENITORI ORIENTATI VERSO UN FENOTIPO MIELOIDE O LINFOIDE, BLOCCATI IN UN PARTICOLARE STADIO DEL PROCESSO DIFFERENZIATIVO.

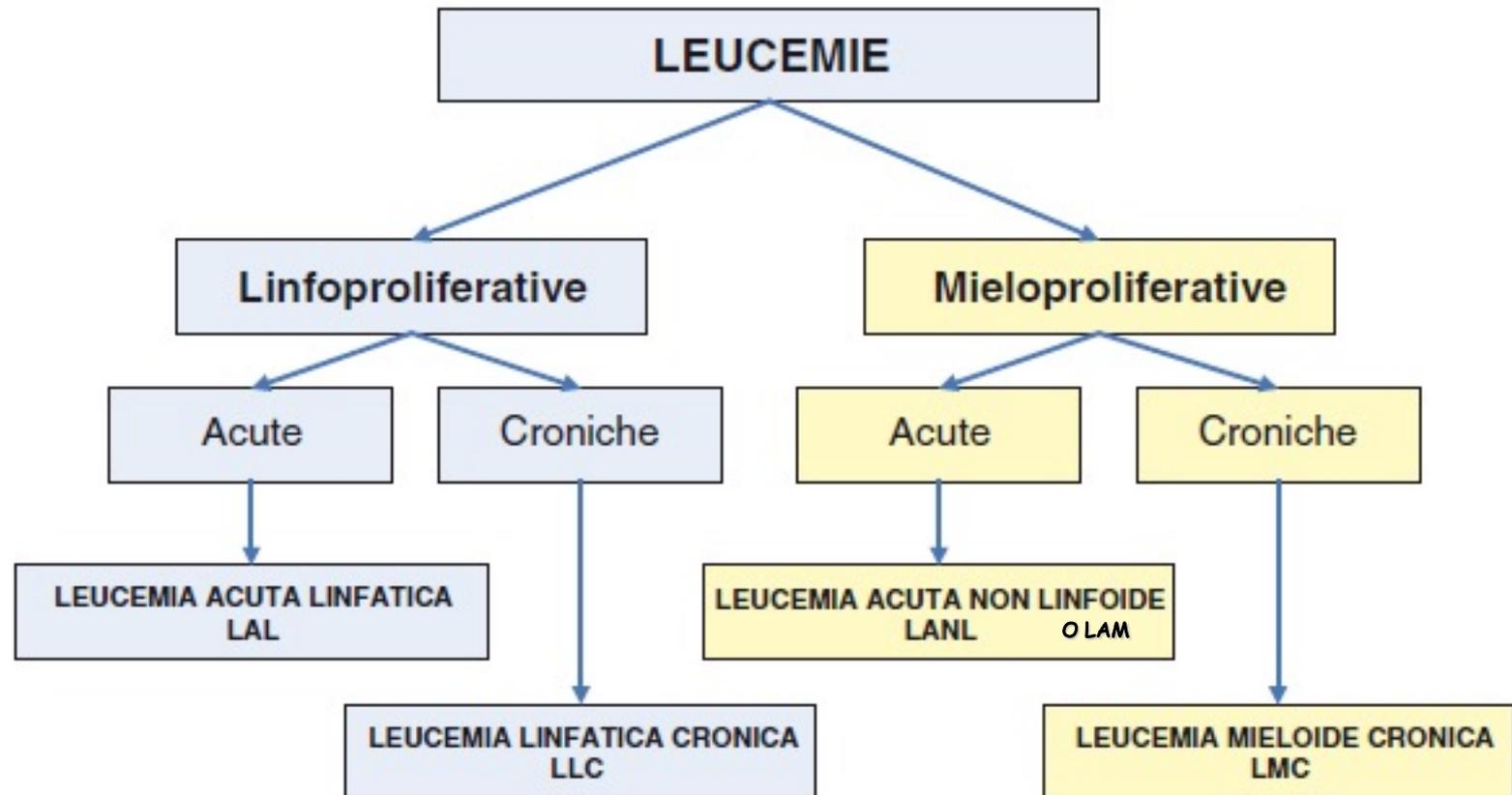
LA MAGGIOR PARTE DELLE LEUCEMIE MOSTRA ALTERAZIONI CROMOSOMICHE E/O MUTAZIONI GENICHE CHE ALTERANO LA PRODUZIONE O L'ATTIVITA' DI PROTEINE REGOLATRICI DELLA PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAZIONE.

LE MUTAZIONI INFLUISCONO SUL CICLO CELLULARE E SULLA MORTE CELLULARE PROGRAMMATA DELLE CELLULE EMOPOIETICHE A VARI LIVELLI MATURATIVI, DANDO ORIGINE AD UN CLONE CHE SI ESPANDE IN MANIERA AUTONOMA.

# EZIOPATOGENESI

Generalmente sconosciuta. Cause ritenute in grado di favorire una trasformazione leucemica sono:

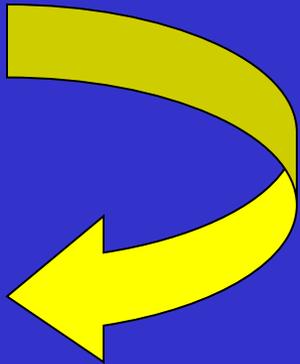
- Radiazioni ionizzanti
- Sostanze chimiche (Benzene, pesticidi)
- Precedenti chemio o radioterapia
- Virus
- Coloranti
- Fumo



**Figura 25.25**

Classificazione generale delle leucemie.

Le leucemie vengono classificate in funzione del grado di maturità delle cellule leucemiche stesse.

**Acute**  **Croniche**

Basso grado di  
maturità

Alto grado di  
maturità

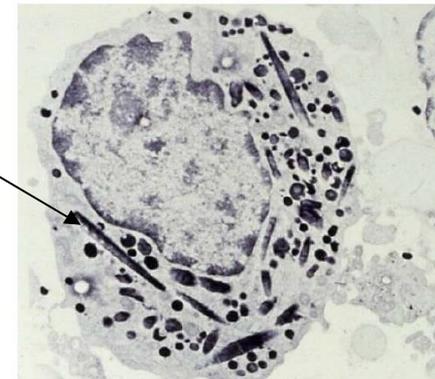
## Tabella 25.21

### Classificazione delle leucemie in base al decorso clinico

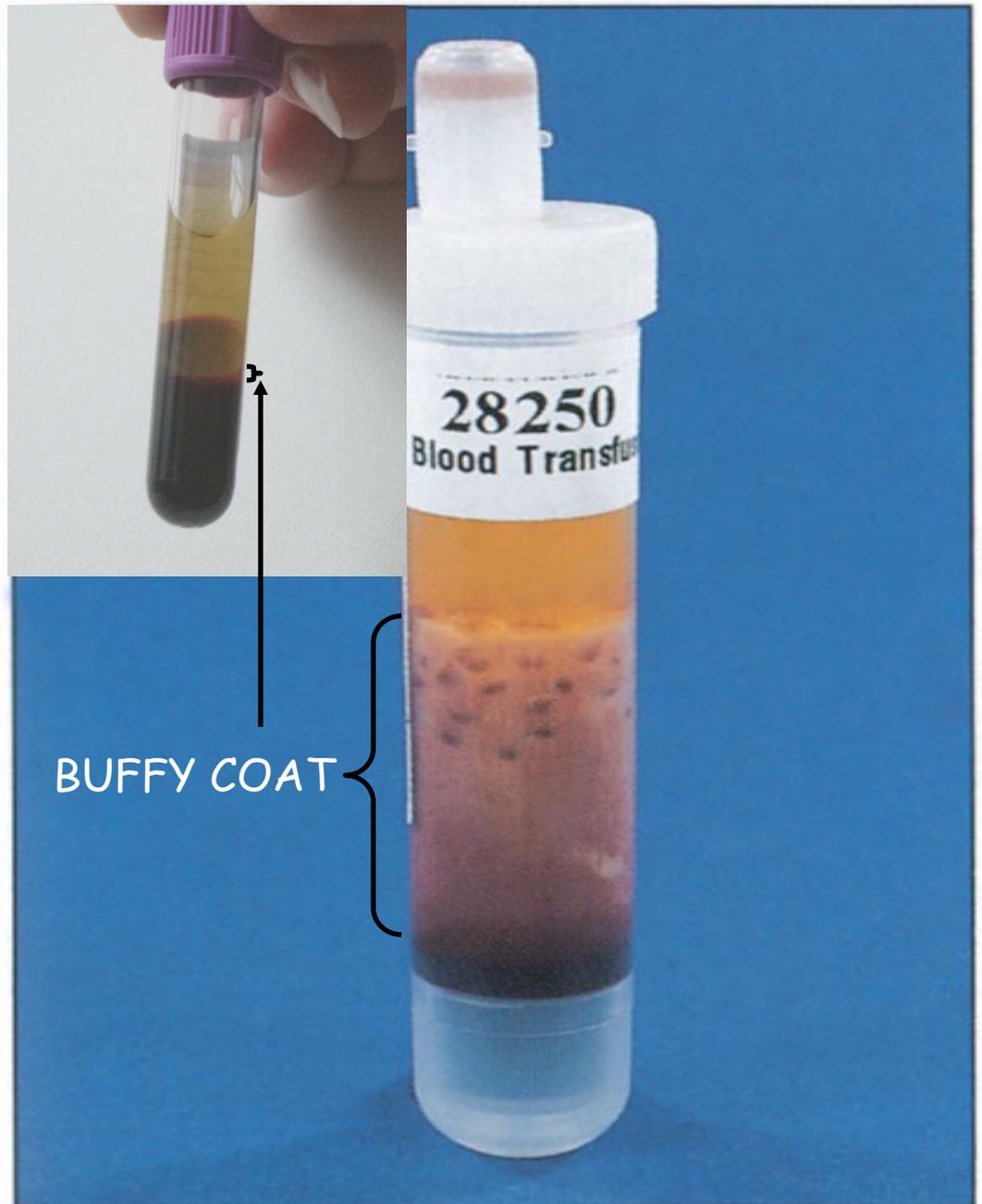
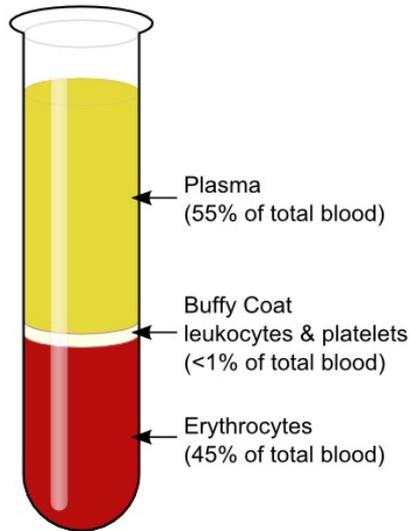
| Caratteristiche          | Acute              | Croniche           |
|--------------------------|--------------------|--------------------|
| Esordio clinico          | Improvviso         | Lento              |
| Progressione             | Rapida             | Lenta              |
| Sintomi                  | Severi             | Moderati           |
| GB numero                | Variabile          | Elevato            |
| GB tipologia             | Immaturi           | Più maturi         |
| Bastoncelli di Auer*     | Possibili          | Mai osservati      |
| Epatosplenomegalia**     | Assente - moderata | Usualmente severa  |
| Anemia e trombocitopenia | Presente           | Presenza variabile |

\*Sono granuli azzurrofili fusi fra loro a formare strutture bastoncellari . Tipicamente alti nella leucemia mieloide acuta

\*\* per accumulo di cellule leucemiche in milza e fegato



Sangue periferico di una donna di 22 anni che mostra un grosso aumento del buffy coat (= globuli bianchi + piastrine)



# LEUCEMIE ACUTE

-ACCUMULO DI CELLULE IMMATURE (**BLASTI**)

- NEL SANGUE (LEUCEMIA, SANGUE BIANCO)
- NEL MIDOLLO E NEI TESSUTI

-INSUFFICIENTE PRODUZIONE DI ALTRI TIPI di CELLULE NEL MIDOLLO (ERITROCITI, GRANULOCITI, PIASTRINE)  
SINTOMI E SEGNI DI **INSUFFICIENZA MIDOLLARE**:  
ANEMIA (e conseguente pallore), INFEZIONI da leucopenia-neutropenia, EMORRAGIE da piastrinopenia

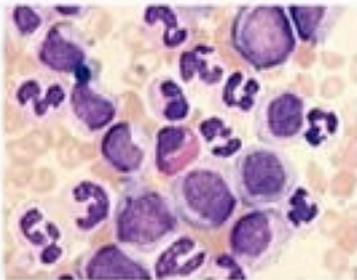
-SINTOMI E SEGNI "TUMORALI" (DA INFILTRAZIONE IN ORGANI / TESSUTI)

# DIAGNOSI DI LEUCEMIA ACUTA

1. VALUTAZIONE CLINICA
2. EMOCROMO
3. VALUTAZIONE MORFOLOGICA DELLE CELLULE DA SANGUE O DA MIDOLLO (IL FENOTIPO MORFOLOGICO SI BASA SULLA MORFOLOGIA DELLE CELLULE BLASTICHE COME SI VEDONO AL MICROSCOPIO OTTICO, COLORATE COL MAY-GRUNWALD-GIEMSA)
4. DEFINIZIONE DELL'IMMUNOFENOTIPO (FENOTIPO "IMMUNOLOGICO" PERCHE' SI BASA SUL RICONOSCIMENTO DI PROTEINE CON ANTICORPI MONOCLONALI); indagine condotta al FACS
5. ANALISI CITOGENETICA (classica e molecolare): RICERCA DI ALTERAZIONI CROMOSOMICHE
6. RICERCA DI ALTERAZIONI GENICHE SPECIFICHE (RT-PCR & NGS)

Diagnostic tests include cytomorphology, immunophenotyping, cytogenetics and molecular analyses

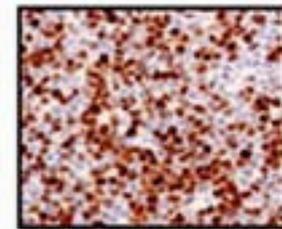
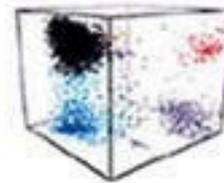
Cytomorphology



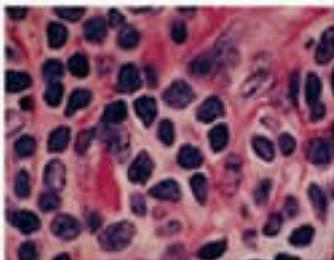
Cytogenetics



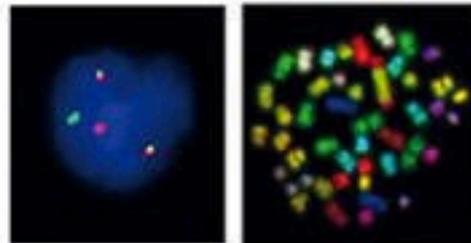
Immunophenotype



Histology



FISH



Molecular genetics

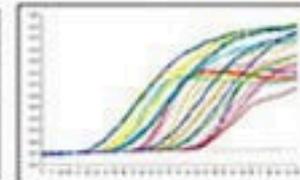
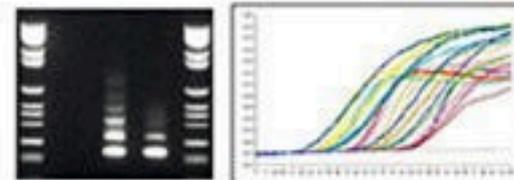


Fig. 1.1

FISH, Fluorescent *in situ* hybridisation.

# EMORRAGIE da PIASTRINOPENIA



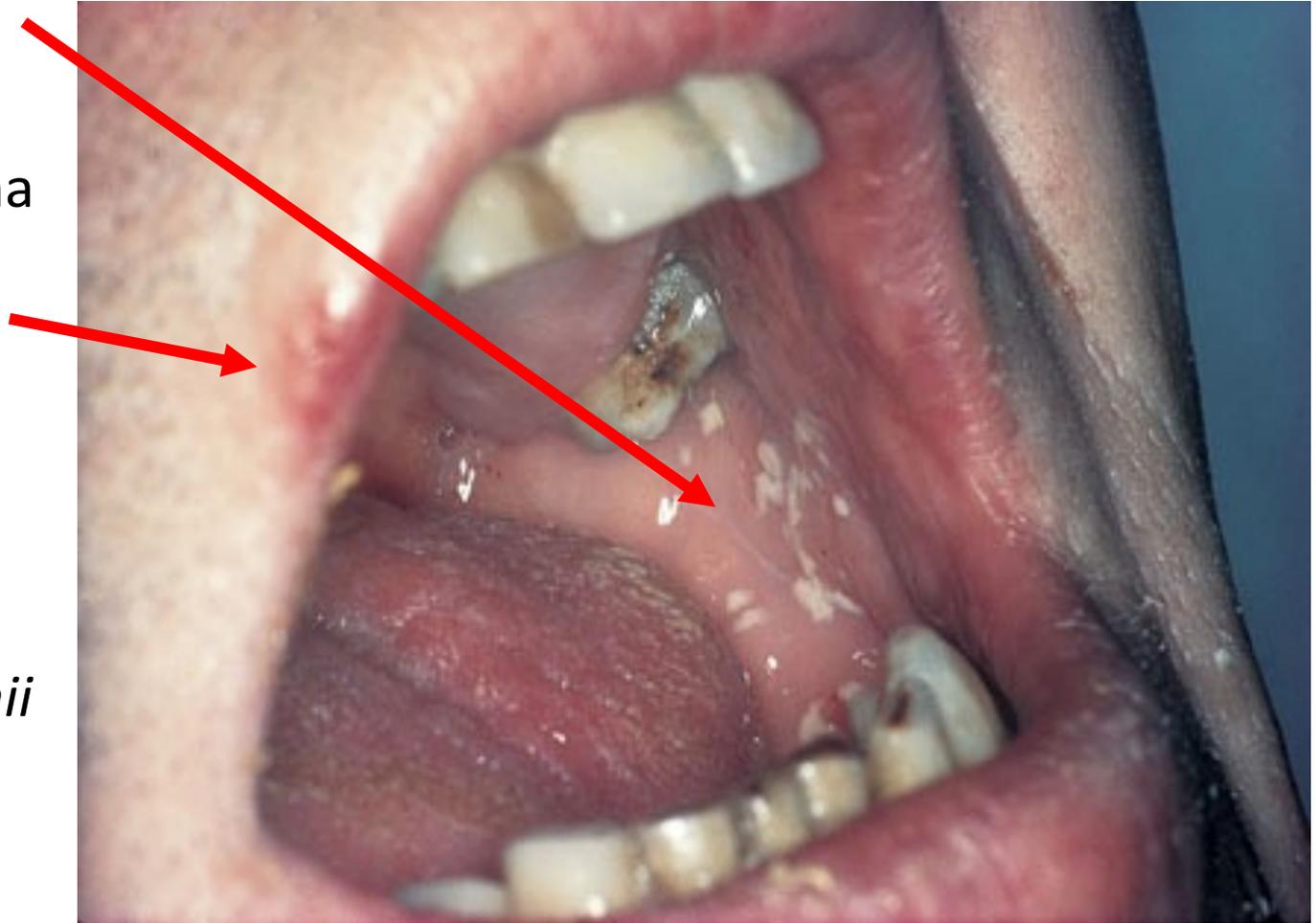
**PETECCHIE**



**ECHIMOSI**

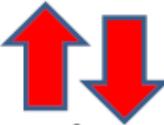
## INFEZIONI da LEUCOPENIA

Leucemia mieloide  
acuta: placche di  
*Candida albicans*  
della bocca, con una  
lesione da *Herpes  
simplex* del labbro  
superiore.



Frequente la  
polmonite da  
*Pneumocystis carinii*

# Alterazioni dell'emocromo

- Globuli Bianchi   
Formula leucocitaria

Leucocitosi  
Leucopenia  
GB normali

} ALTERAZIONI  
VARIABILI DEL  
NUMERO  
DIGLOBULI  
BIANCHI

- Emoglobina 

Anemia

- Piastrine 

Piastrinopenia

# BLASTI

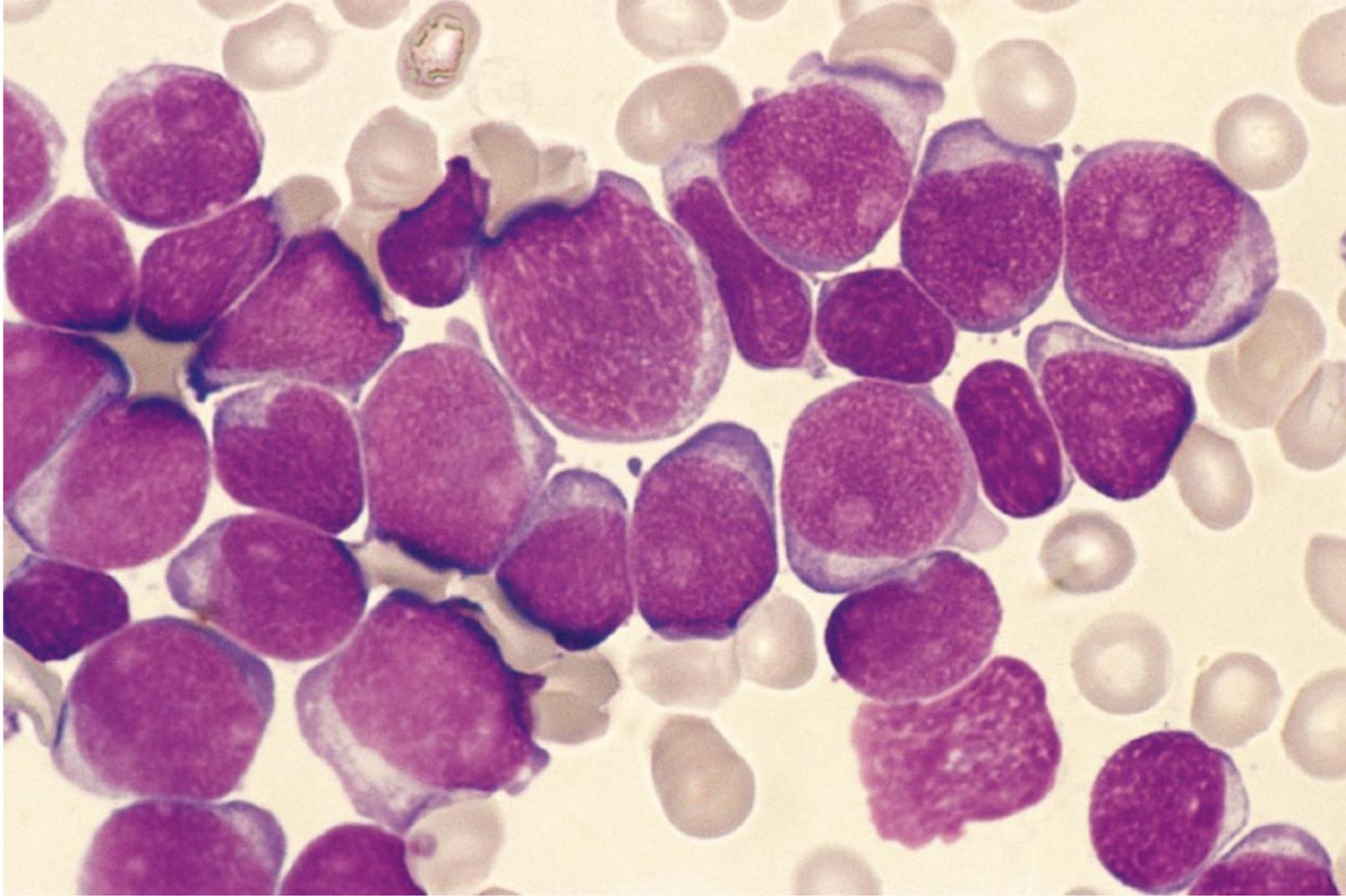
Cellule che hanno perso la capacità di dare origine alle cellule più mature: esse dal midollo passano nel sangue periferico e continuano a dividersi, aumentando progressivamente di numero

Es: Leucemia acuta:

Sangue midollare:      blasti > 20% delle cellule totali;

Sangue periferico:      blasti > 10% delle cellule totali

# BLASTI

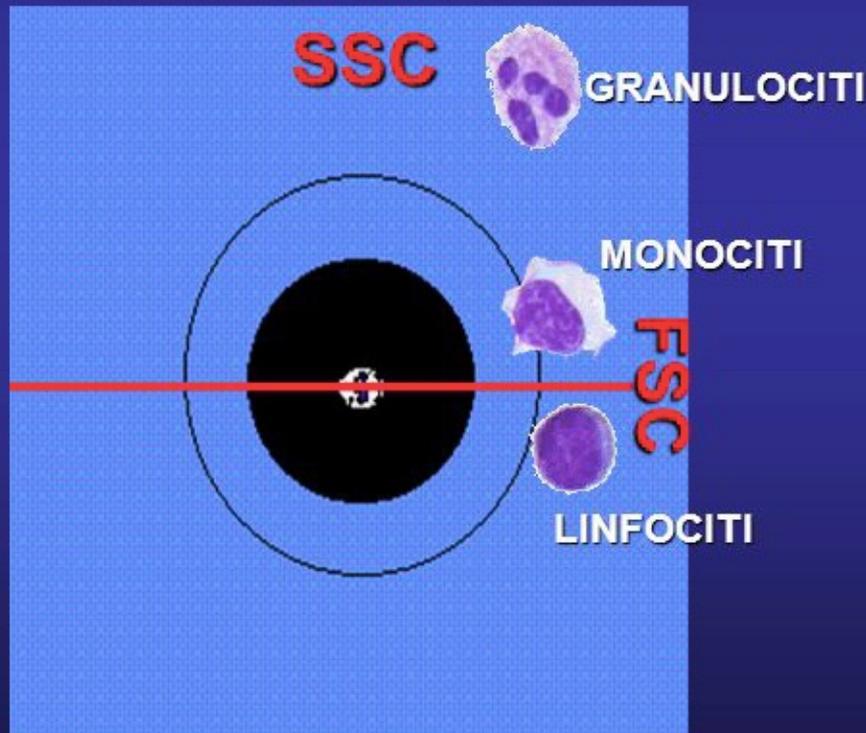


Può essere di aiuto nella diagnostica l'uso del citofluorimetro, non solo per determinare l'immunofenotipo (vedi oltre) ma anche per vedere se ci sono marcate differenze in termini numerici nelle singole popolazioni del sangue rispetto ad una condizione normale

# Generazione dei segnali di “scatter”

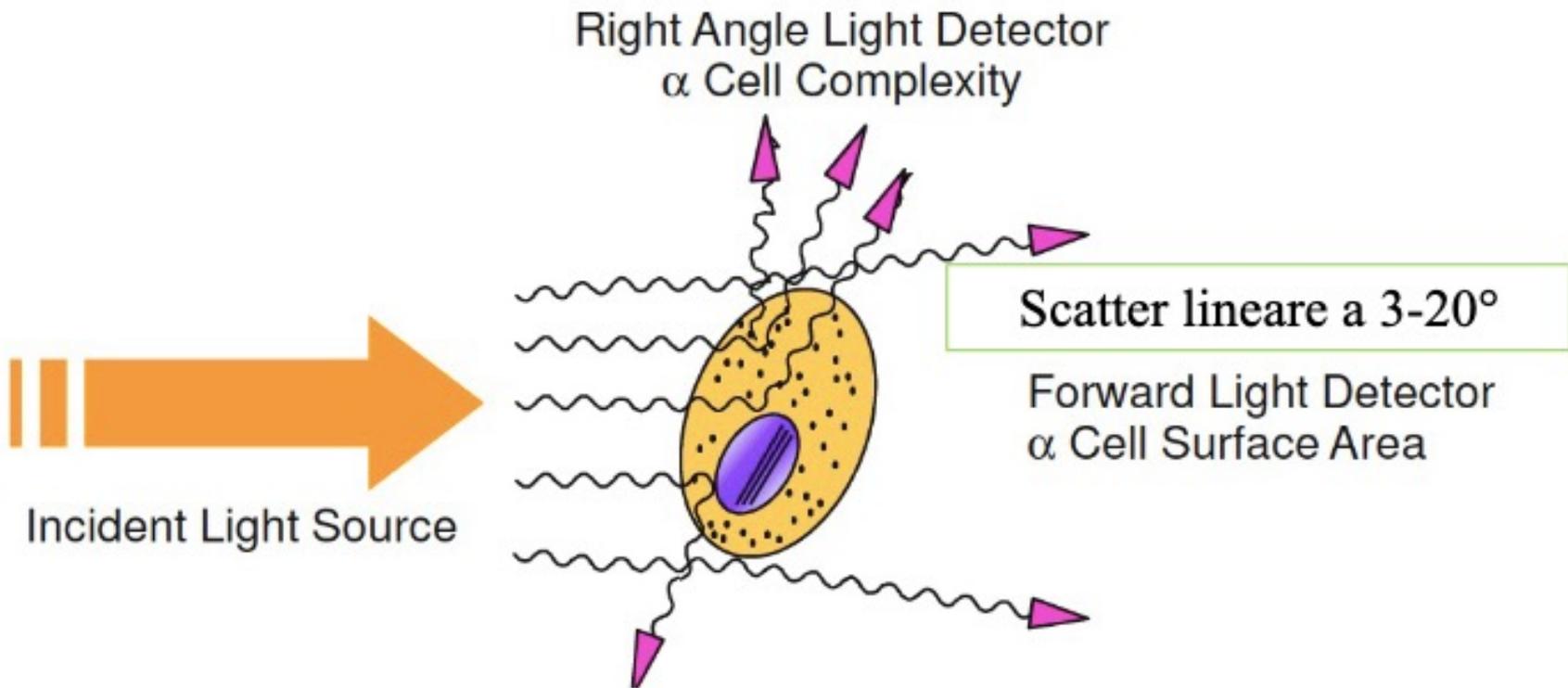
## Rifrazione & Riflessione:

proporzionale alla granularità cellulare e alla complessità rilevate a  $90^\circ$  rispetto la luce incidente.

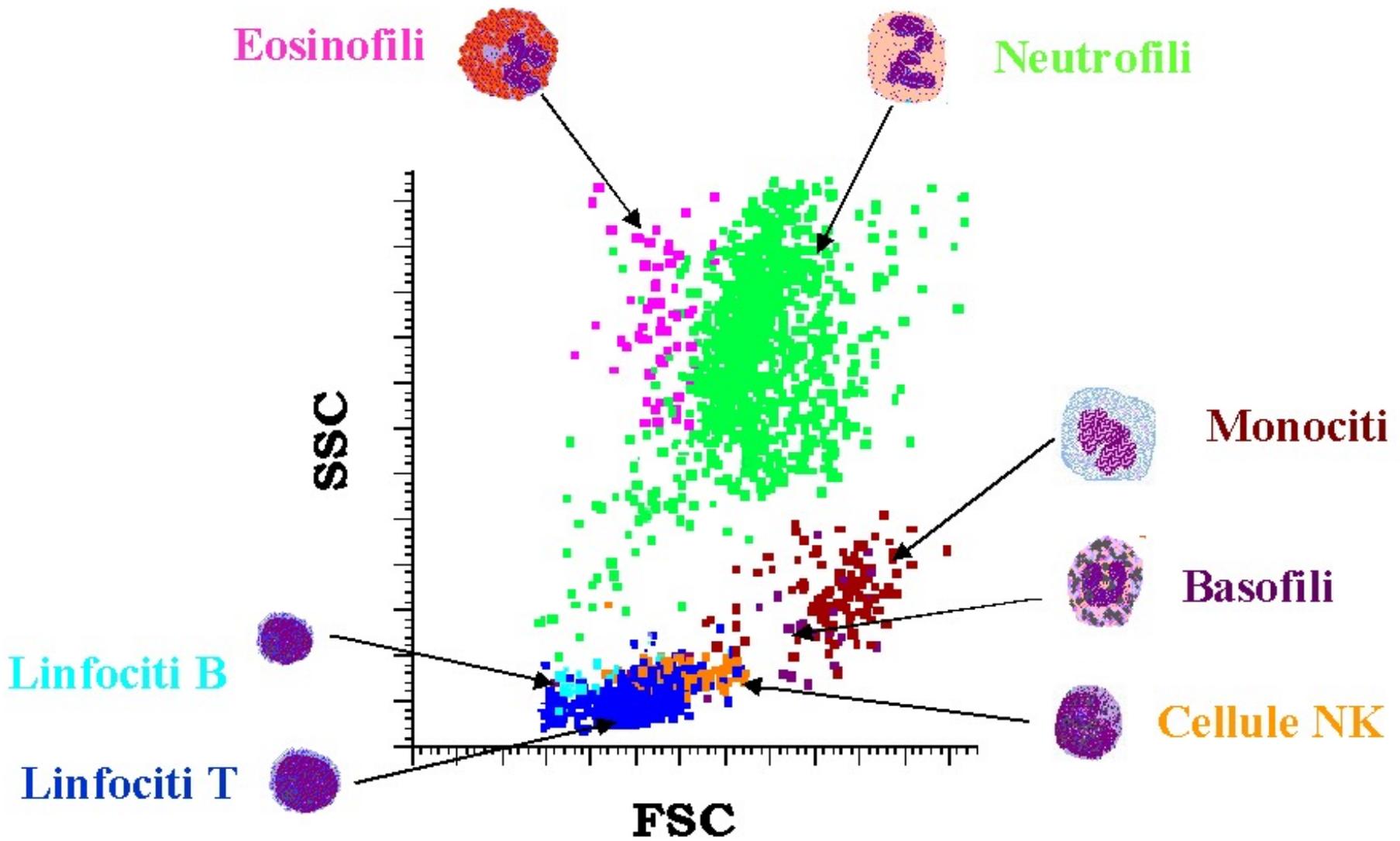


## Diffrazione:

proporzionale alle dimensioni della cellula rilevata lungo l'asse della luce incidente  $0^\circ$



# SOTTOPOPOLAZIONI LEUCOCITARIE IN SANGUE PERIFERICO-CITOGRAMMA



# MATURAZIONE MIELOIDE:

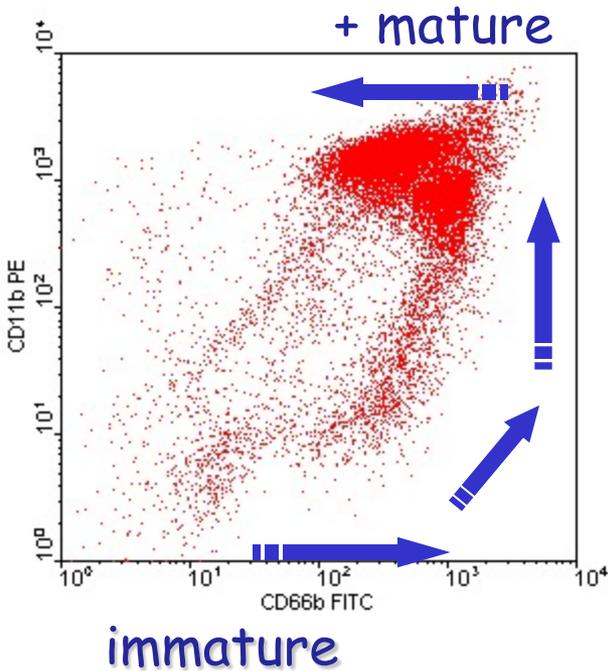
## granulocitopoiesi

|       | stem cell | Blasto mieloide | promielocita | Mielocita | Meta mielocita | granulocita |  |
|-------|-----------|-----------------|--------------|-----------|----------------|-------------|--|
| CD34  | CD34      |                 |              |           |                |             |  |
| CD13  |           | CD13            |              |           |                |             |  |
| CD33  |           | CD33            |              |           |                |             |  |
| CD66c |           |                 | CD66c        |           |                |             |  |
| CD66b |           |                 | CD66b        |           |                |             |  |
| CD11c |           |                 |              | CD11c     |                |             |  |
| CD11b |           |                 |              | CD11b     |                |             |  |
| CD11a |           |                 |              |           |                | CD11a       |  |
| CD16  |           |                 |              |           | CD16           |             |  |
| CD64  |           |                 | CD64         |           |                |             |  |
| CD15  |           |                 | CD15         |           |                |             |  |

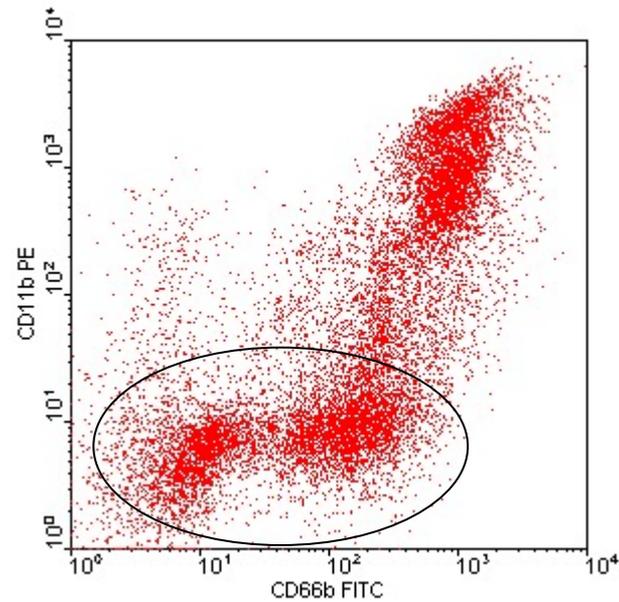
# Maturazione Mieloide

## Interpretazione su CD66b/CD11b

BM normale

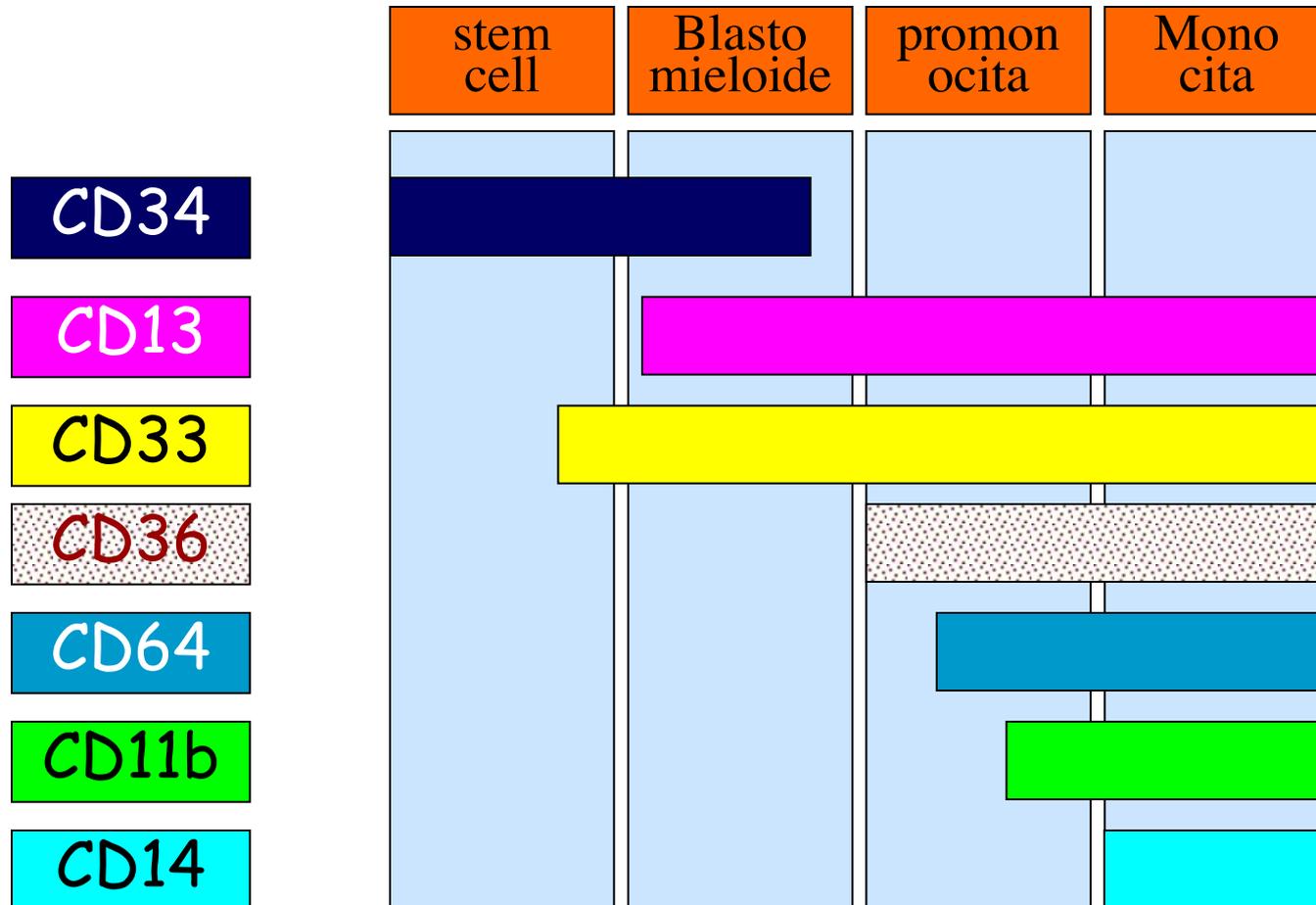


BM con blocco maturativo

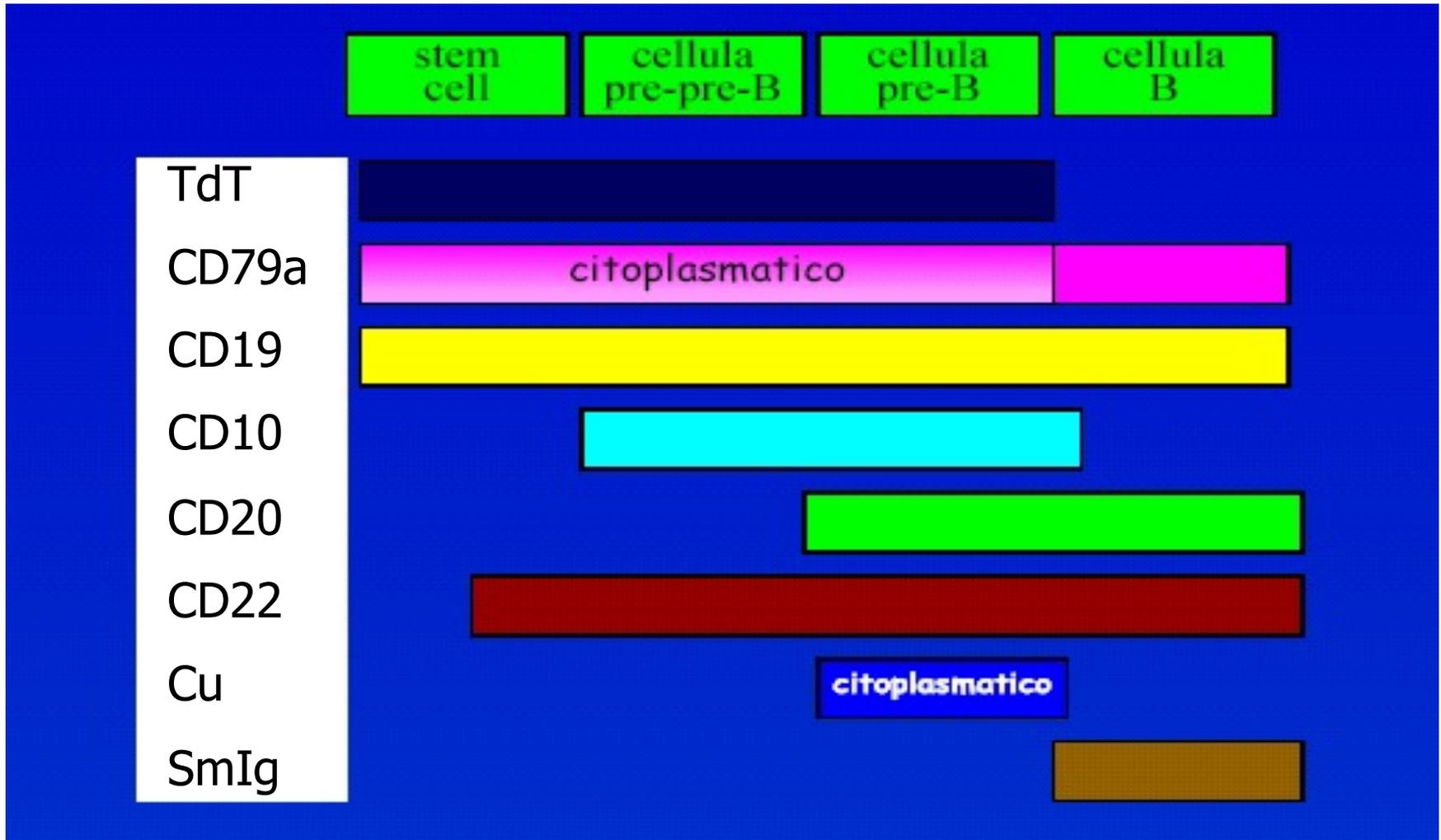


# MATURAZIONE MIELOIDE

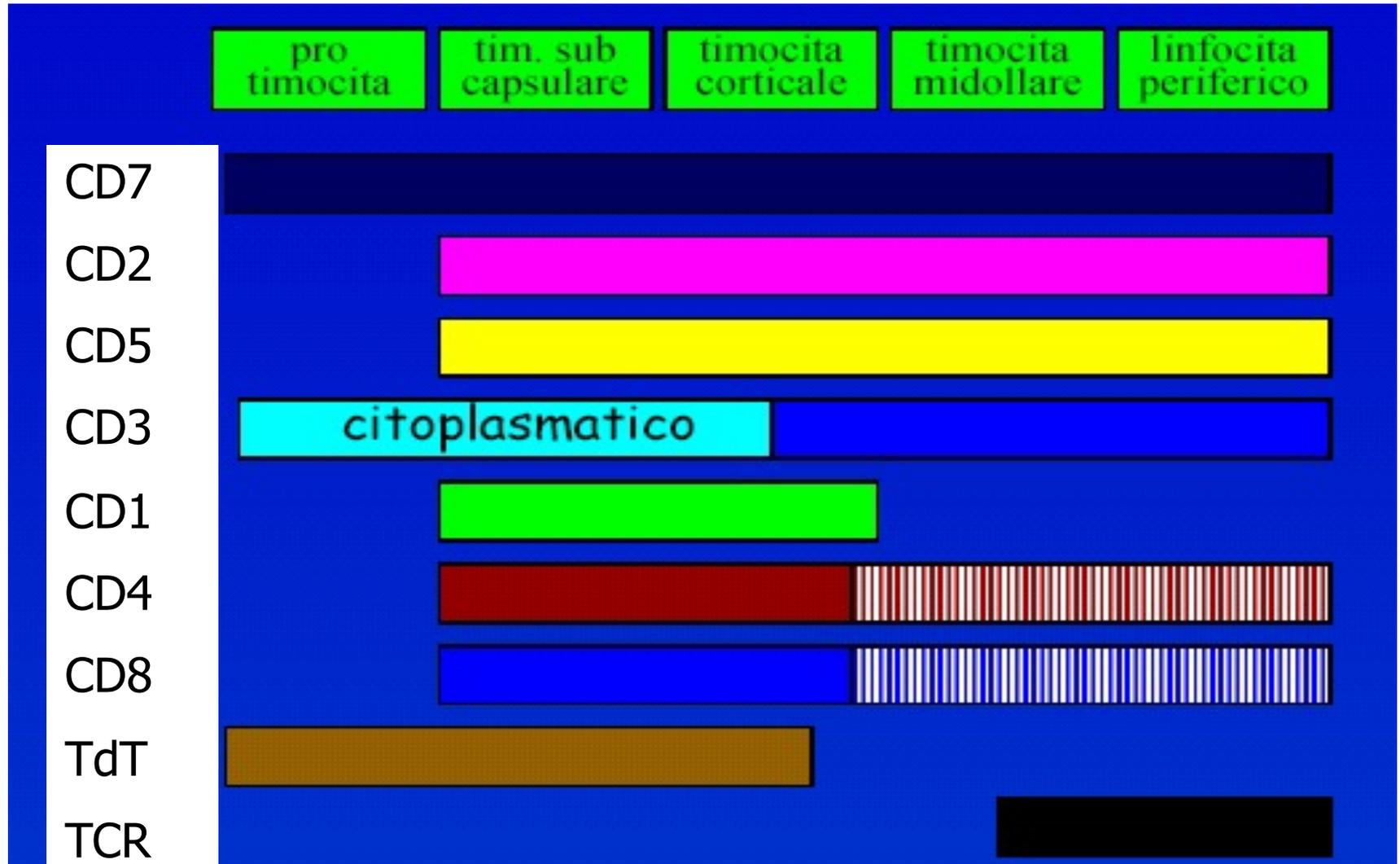
## monocitopoiesi



# Marcatori B-lineage



# Marcatori T-lineage



Le leucemie (specialmente quelle acute) derivano da alterazioni molecolari presenti a livello di un precursore ematopoietico.

### **GENI COINVOLTI**

**ONCOGENI:** i prodotti di tali geni promuovono positivamente la proliferazione cellulare.

**ONCOSOPPRESSORI:** i prodotti di tali geni inibiscono la proliferazione cellulare.

# Geni di Fusione

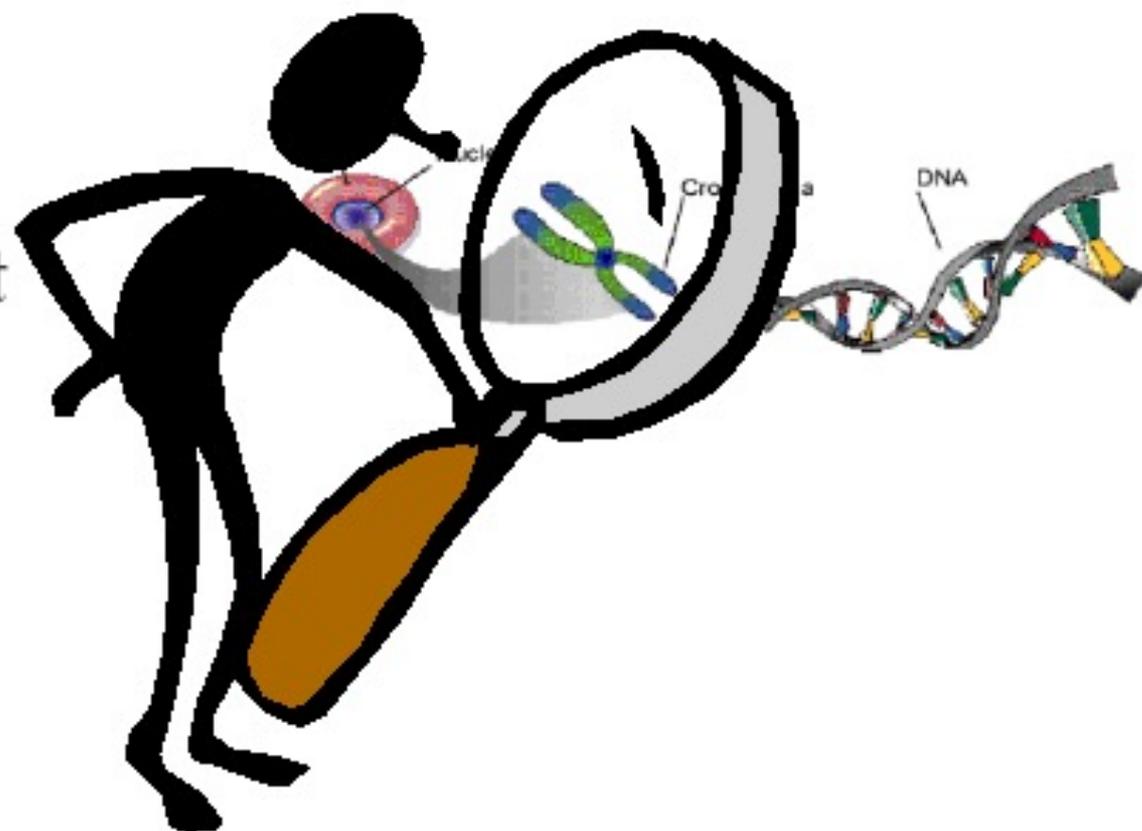
- Si definiscono **geni di fusione** gli oncogeni associati a traslocazioni cromosomiche specifiche, generati dalla ricombinazione tra due geni.

# Traslocazioni nelle Leucemie Acute

| Patologia | Traslocazione | Geni coinvolti                       |
|-----------|---------------|--------------------------------------|
| M2        | t(8;21)       | <i>ETO-AML1</i>                      |
| M2 & M4   | t(6;9)        | <i>DEK-CAN</i>                       |
| M3        | t(15;17)      | <i>PML-RAR<math>\alpha</math></i>    |
| M4        | inv(16)       | <i>CBF<math>\beta</math>-MYH11</i>   |
| B-ALL     | t(9;22)       | <i>BCR-ABL</i>                       |
|           | t(1;19)       | <i>E2A-PBX1</i>                      |
|           | t(17;19)      | <i>HLF-E2A</i>                       |
|           | t(12;21)      | <i>TEL-AML-1</i>                     |
|           | t(4;11)       | <i>AF4-MLL</i>                       |
|           | t(8;14)       | <i>MYC-IgH</i>                       |
| T-ALL     | TAL deletion  | <i>TAL</i>                           |
|           | t(1;14)       | <i>TAL-1-TCR<math>\delta</math></i>  |
|           | t(10;14)      | <i>HOX11-TCR<math>\alpha</math></i>  |
|           | t(11;14)      | <i>11p13- TCR<math>\delta</math></i> |

# La Citogenetica Classica

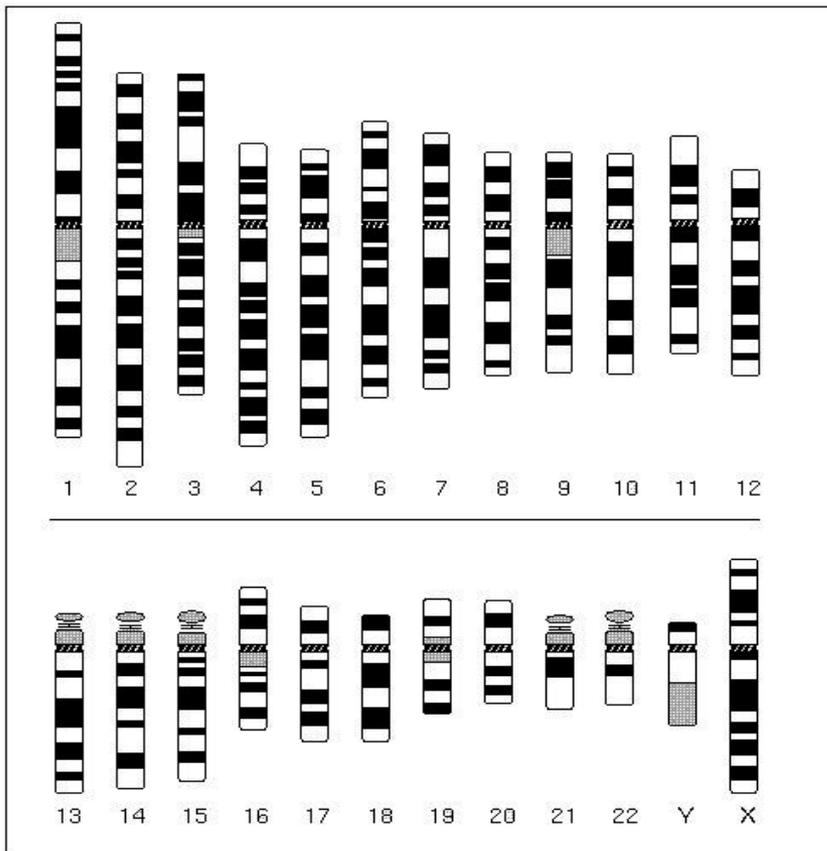
☛ Permette di identificare riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti non meno di 5 Mb.



# BANDEGGIAMENTO CROMOSOMICO

Lo sviluppo del bandeggiamento (Caspersson, 1968 ) ha costituito un progresso decisivo per le analisi citogenetiche e ha permesso di individuare singoli cromosomi.

Vari trattamenti denaturanti consentono di colorare cromosomi, dando in modo riproducibile una sequenza di bande chiare e scure.



Il numero del cromosoma è seguito da p (braccio corto) o q (braccio lungo) e dal numero della banda, esempio **11q23** significa, l'estremità del braccio lungo q del cromosoma 11, banda 2 sottobanda 3.

## Cariotipo Convenzionale (CC)

Aspirato midollare  
(sangue periferico)

Conteggio nucleate

Semina in terreno

Coltura per 24 - 72 h

Colchicina

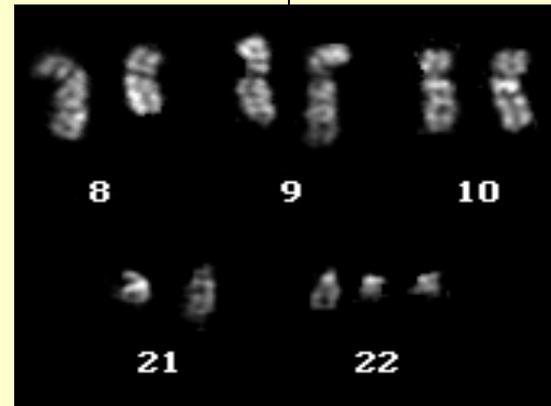
Fissazione e lavaggi

Allestimento  
dei vetrini

Colorazione (bandeggio)

Selezione e cattura immagini

Elaborazione e cariotipizzazione



Conclusione diagnostica

**Bandeggio GTG (G-Trypsin-Giemsa):**

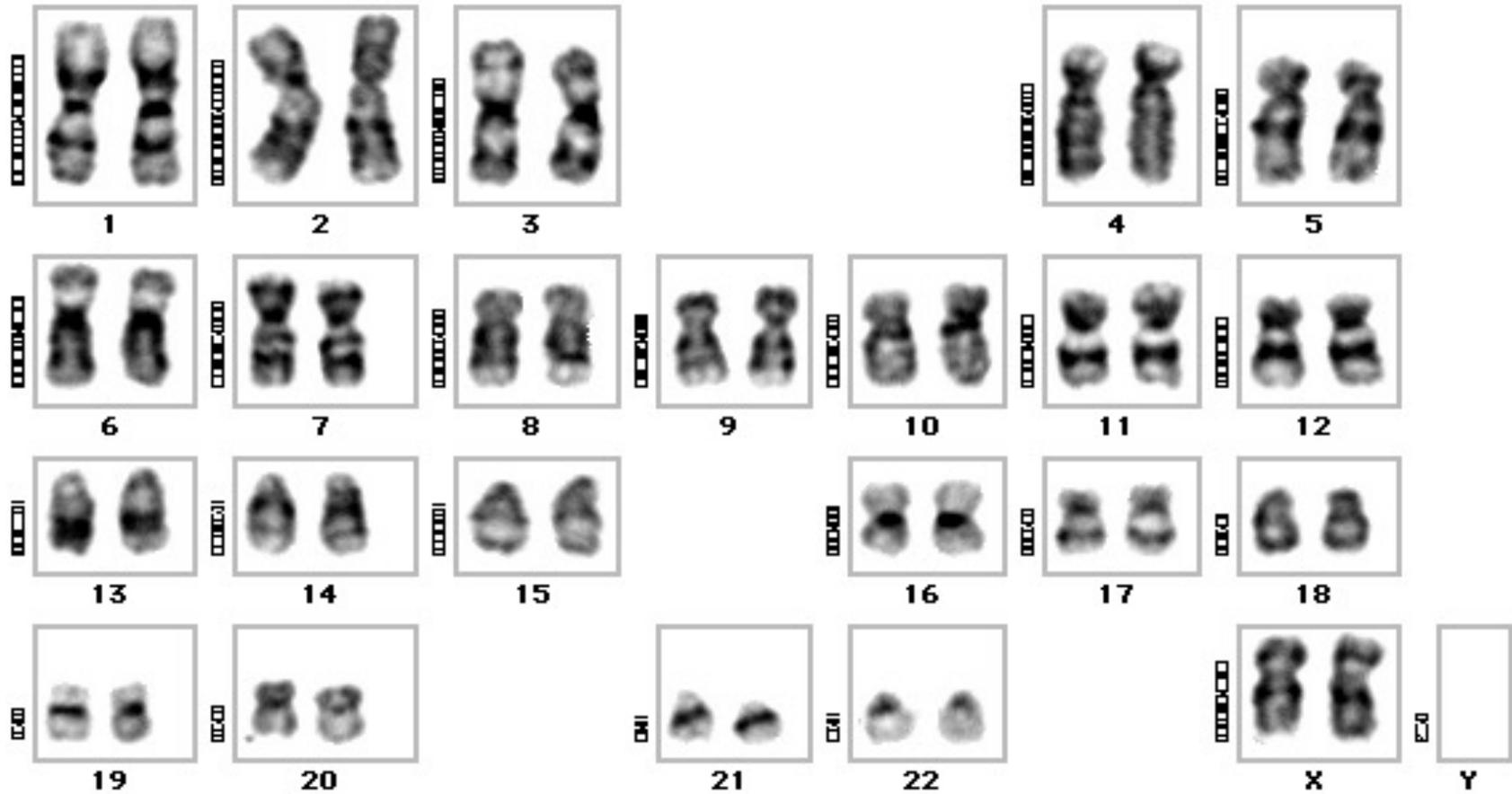
**-E' uno dei bandeggi più largamente utilizzati. Consiste nel trattare i cromosomi con un enzima proteolitico, la tripsina, che digerisce le proteine istoniche.**

**- In seguito si immergono i vetrini in una soluzione di Giemsa, una miscela di azur II ed azur II eosina, e questo consente la visualizzazione delle bande cosiddette G.**

METAFASE DA  
ORDINARE

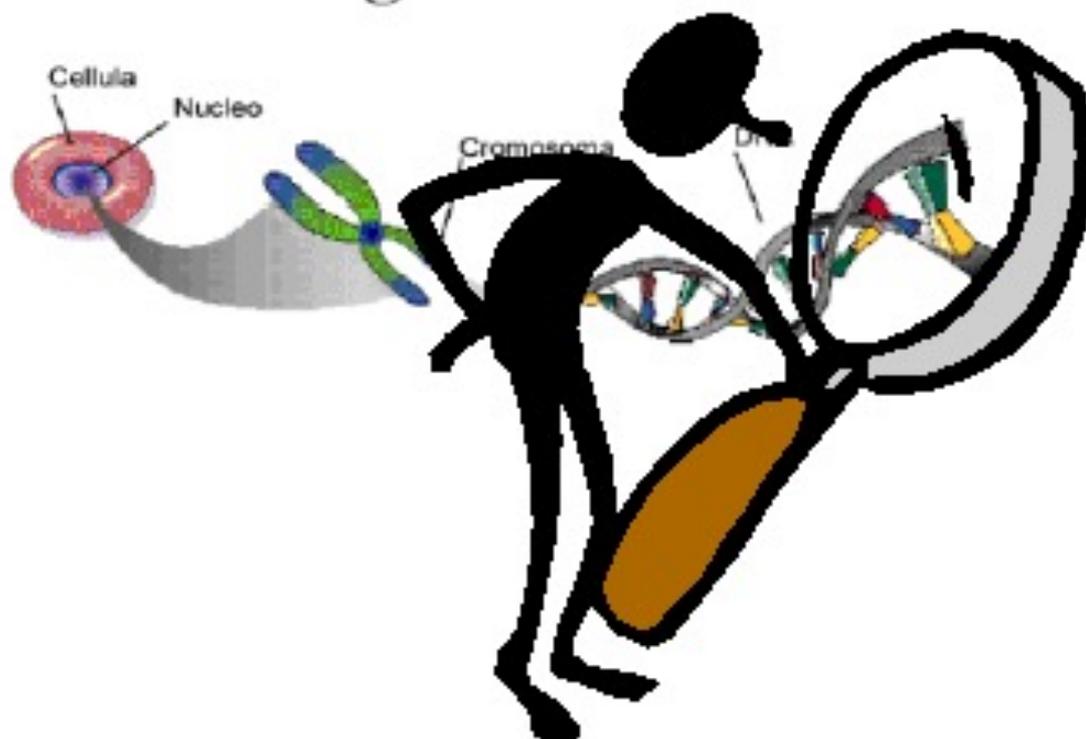


# CARIOTIPO COSTITUZIONALE: METAFASE ORDINATA

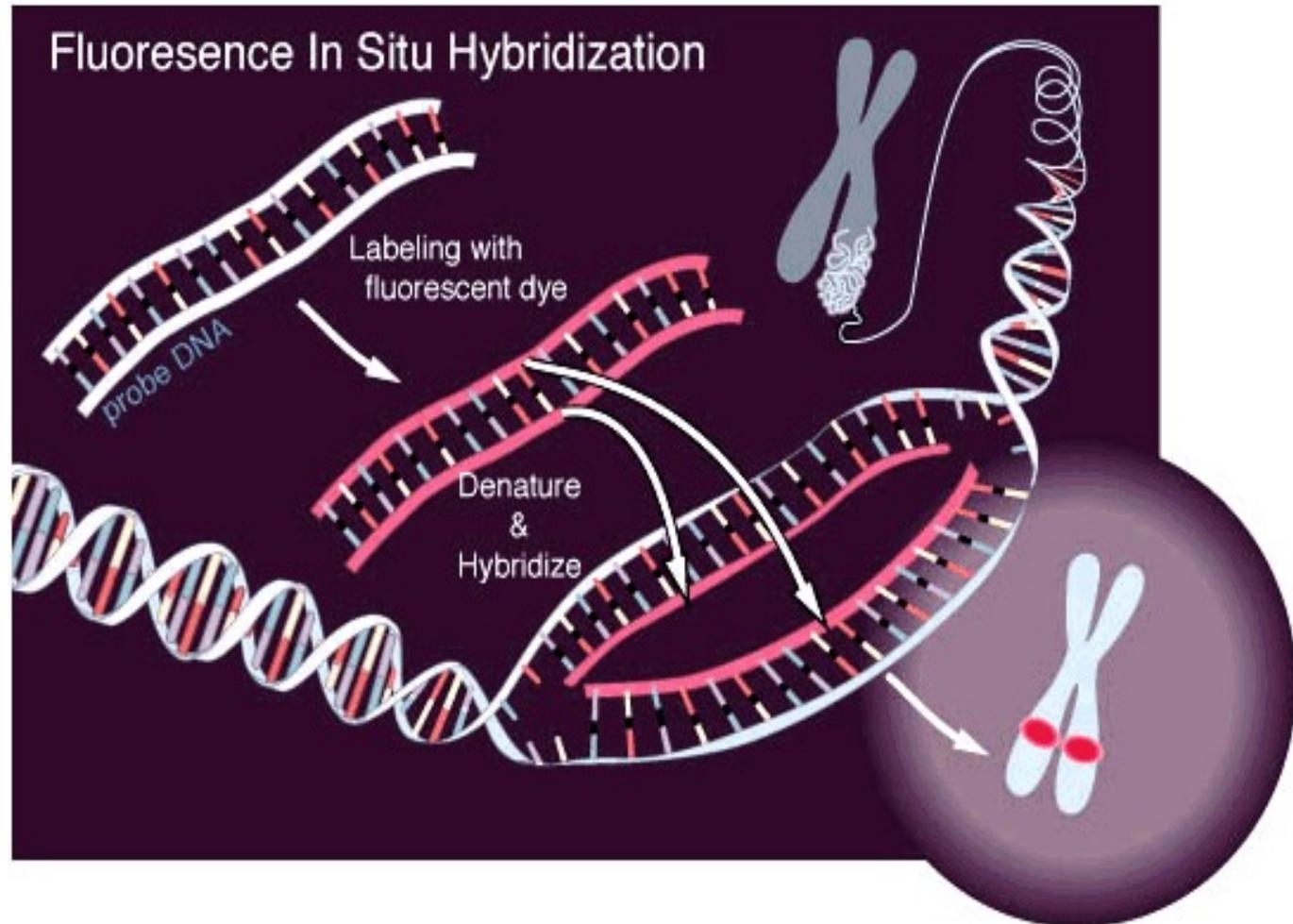


# **La Citogenetica Molecolare**

**Abbina la possibilità di un'analisi del DNA, propria delle tecniche di biologia molecolare, con la struttura cromosomica il cui studio è oggetto della citogenetica classica.**



Permette un'analisi mirata di una regione cromosomica consentendo di mettere in evidenza riarrangiamenti di alcune centinaia di chilobasi.



Tale identificazione avviene mediante sonde marcate impiegando fluorocromi che emettono a diverse lunghezze d'onda.

La FISH consente di ottenere una maggiore precisione diagnostica

## Cariotipo Convenzionale (CC)

## Ibridazione in Situ (FISH)

Aspirato midollare  
(sangue periferico)

Conteggio nucleate

Semina in terreno

Coltura per 24 - 72 h

Colchicina

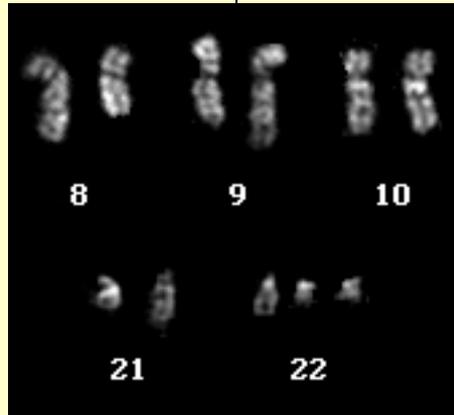
Fissazione e lavaggi

Allestimento  
dei vetrini

Colorazione (bandeggio)

Selezione e cattura immagini

Elaborazione e cariotipizzazione



Conclusione diagnostica

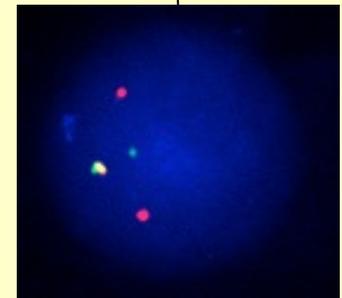
Scelta delle sonde

Denaturazione e  
Ibridazione over night

Lavaggi e  
controcolorazione

Valutazione immagini

Cattura / elaborazione

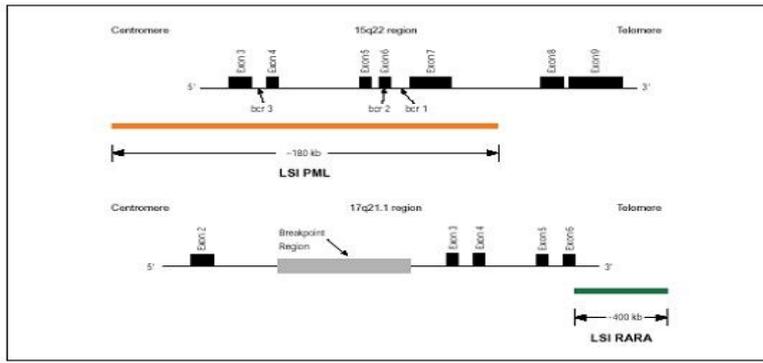


Conclusione diagnostica

# SONDE:

- **Sonde locus-specifiche:** sono sonde molto piccole che riconoscono porzioni corte del cromosoma; vengono utilizzate per evidenziare aberrazioni che coinvolgono un gene o una parte di esso.
- **Sonde chromosome painting:** riconoscono sequenze specifiche per ogni singolo cromosoma localizzate lungo tutto il suo asse; il cromosoma appare interamente colorato.
- **Sonde centromeriche (o alfoidi):** riconoscono brevi sequenze centromeriche di DNA altamente ripetitive, specifiche per ciascun cromosoma.
- **Sonde telomeriche:** sono utili nell'identificazione di traslocazioni che coinvolgono le regioni telomeriche.

SONDA (LSI) DOPPIO COLORE PER t(PML /RAR  $\alpha$ )



DESCRIZIONE

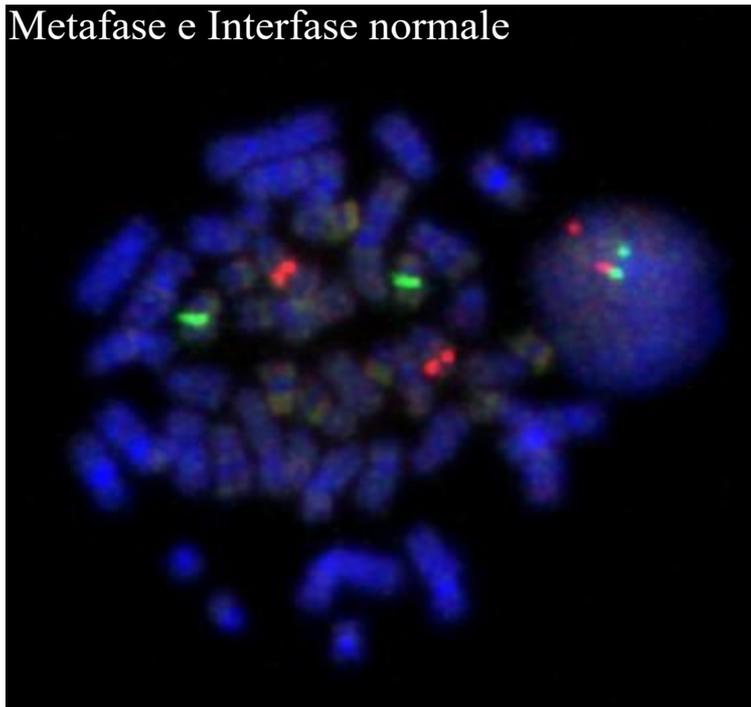
METAFASE e INTERFASE NORMALI,  
MOSTRANO: 4 SEGNALI

DUE VERDI (RAR  $\alpha$  regione 17q21,1)

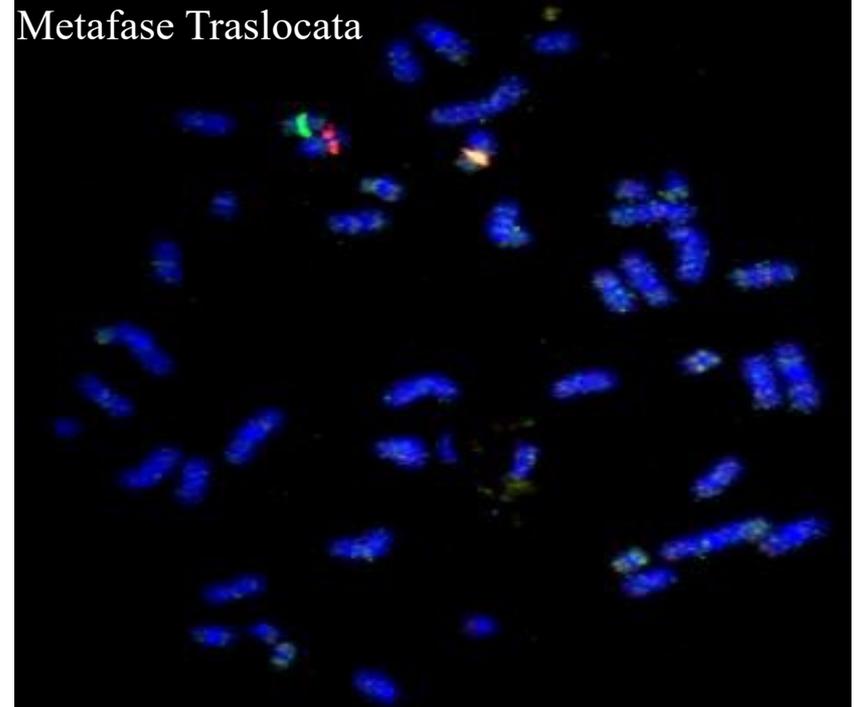
DUE ROSSI (PML regione 15q22).

METAFASE TRASLOCATA, MOSTRA: UN  
SEGNALE VERDE (RAR  $\alpha$ ) UNO ROSSO (PML) e  
UN SEGNALE DI FUSIONE DEI DUE GENI  
GIALLO/BIANCO (PML-RAR  $\alpha$ )

Metafase e Interfase normale



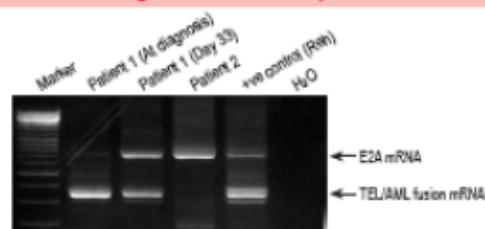
Metafase Traslocata



# Diagnostica Molecolare per LAM (routine) – cerca trascritti di fusione per PCR

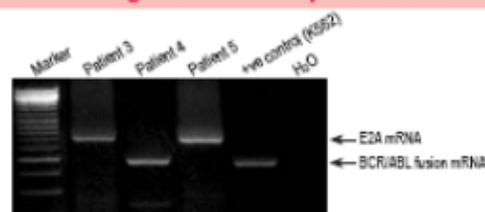
| Chromosomal Alteration | Genes Involved                          | Fusion Gene          | Multiplex No. |
|------------------------|---|----------------------|---------------|
| t(X;11)(q13;q23)       | MLL (11q23); AFX (Xq13)                 | MLL/AFX              | R1            |
| t(6;11)(q27;q23)       | MLL (11q23); AF6 (6q27)                 | MLL/AF6              | R1            |
| t(11;19)(q23;p13.1)    | MLL (11q23); ELL (19p13.1)              | MLL/ELL              | R1            |
| inv(16)(p13q22)        | CBF (16q22); MYH11 (16p13)              | CBF/MYH11            | R1            |
| t(1;11)(p32;q23)       | MLL (11q23); AF1p (1p32)                | MLL/AF-qp; MLL/AF-1p | R2            |
| t(10;11)(p12;q23)      | MLL (11q23); AF10 (10p12)               | MLL/AF10             | R2            |
| dup MLL (11q23)        | MLL (11q23); MLL (11q23)                | MLL/MLL              | R2            |
| t(11;17)(q23;q21)      | MLL (11q23); AF17 (17q21)               | MLL/AF17             | R2            |
| TAL1D                  | SIL (1p34); TAL1 (1p34)                 | SIL/TAL1             | R3            |
| t(1;19)(q23;p13)       | E2A (19p13); PBX1 (1q23)                | E2A/PBX1             | R3            |
| t(12;21)(p13;q22)      | TEL (12p13); AML1 (21q22)               | TEL/AML1             | R3            |
| t(17;19)(q22;p13)      | E2A (19p13); HLF (17q22)                | E2A/HLF              | R3            |
| t(3;21)(q26;q22)       | AML1 (21q22); MDS1 (3q26) (EVI1) (3q26) | AML1/MDS1/(EVI1)     | R4            |
| t(8;21)(q22;q22)       | AML1 (21q22); ETO (8q22)                | AML1/ETO             | R4            |
| t(16;21)(p11;q22)      | TLS (16p11); ERG (21q22)                | TLS/ERG              | R4            |
| t(1;11)(q21;q23)       | MLL (11q23); AF1q (1q21)                | MLL/AF1q             | R5            |
| t(9;11)(p22;q23)       | MLL (11q23); AF9 (9p22)                 | MLL (11q23)          | R5            |
| t(11;19)(q23;p13.3)    | MLL (11q23); ENL (19p13.3)              | MLL/ENL              | R5            |
| t(4;11)(q21;q23)       | MLL (11q23); AF4 (4q21)                 | MLL/AF4              | R5            |
| t(5;12)(q33;p13)       | TEL (12p13); PDGFR (5q33)               | TEL/PDGFR            | R6            |
| t(9;12)(q34;p13)       | TEL (12p13); ABL (9q34)                 | TEL/ABL              | R6            |
| t(9;22)(q34;q11)       | BCR (22q11); ABL (9q34)                 | BCR/ABL              | R6            |
| t(6;9)(p23;q34)        | DEK (6p23); CAN (9q34)                  | DEK/CAN              | R7            |
| ?t(9;9)                | SET (9q34); CAN (9q34)                  | SET/CAN              | R7            |
| t(11;17)(q23;q21)      | PLZF (11q23); RARA (17q21)              | PLZF/RARA            | R8            |
| t(15;17)(q21;q22)      | PML (15q21); RARA (17q21)               | PML/RARA             | R8            |
| t(2;5)(p23;q35)        | NPM (5q35); ALK (2p23)                  | NPM/ALK              | R8            |
| t(3;5)(q25.1;q34)      | NPM (5q35); MLF1 (3q25.1)               | NPM/MLF1             | R8            |
| t(5;17)(q35;q22)       | NPM (5q35); RARA (17q21)                | NPM/RARA             | R8            |

## TEL/AML1 gene fusion multiplex RT-PCR



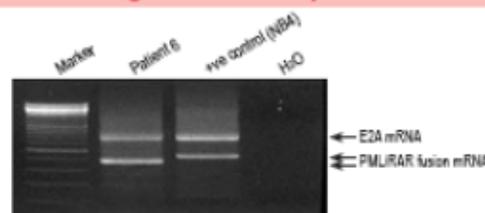
Patient 1: positive for TEL/AML1 gene fusion  
Patient 2: negative for TEL/AML1 gene fusion

## BCR/ABL gene fusion multiplex RT-PCR



Patient 3: negative for BCR/ABL gene fusion  
Patient 4: positive for BCR/ABL gene fusion  
Patient 5: negative for BCR/ABL gene fusion

## PML/RAR gene fusion multiplex RT-PCR



Patient 6: positive for PML/RAR gene fusion

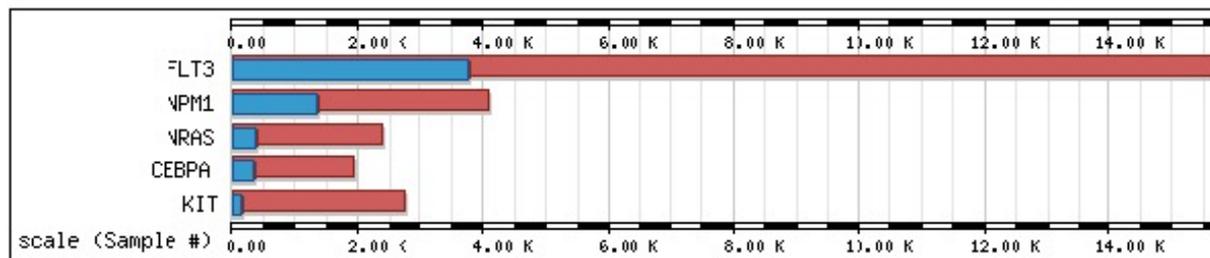
N.B: Oltre alle alterazioni citogenetiche maggiori, nelle LAM si riscontrano spesso mutazioni puntiformi di alcuni geni (+/- associate).

## A CENSUS OF HUMAN CANCER GENES

NATURE REVIEWS | **CANCER** | MARCH 2004 | VOLUME 4

*P. Andrew Futreal\*, Lachlan Coin\*, Mhairi Marshall\*, Thomas Down\*,  
Timothy Hubbard\*, Richard Wooster\*, Nazneen Rahman† and Michael R. Stratton\*\**

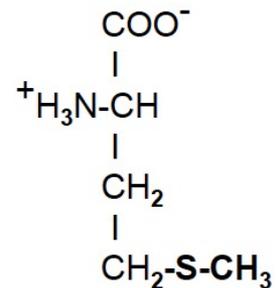
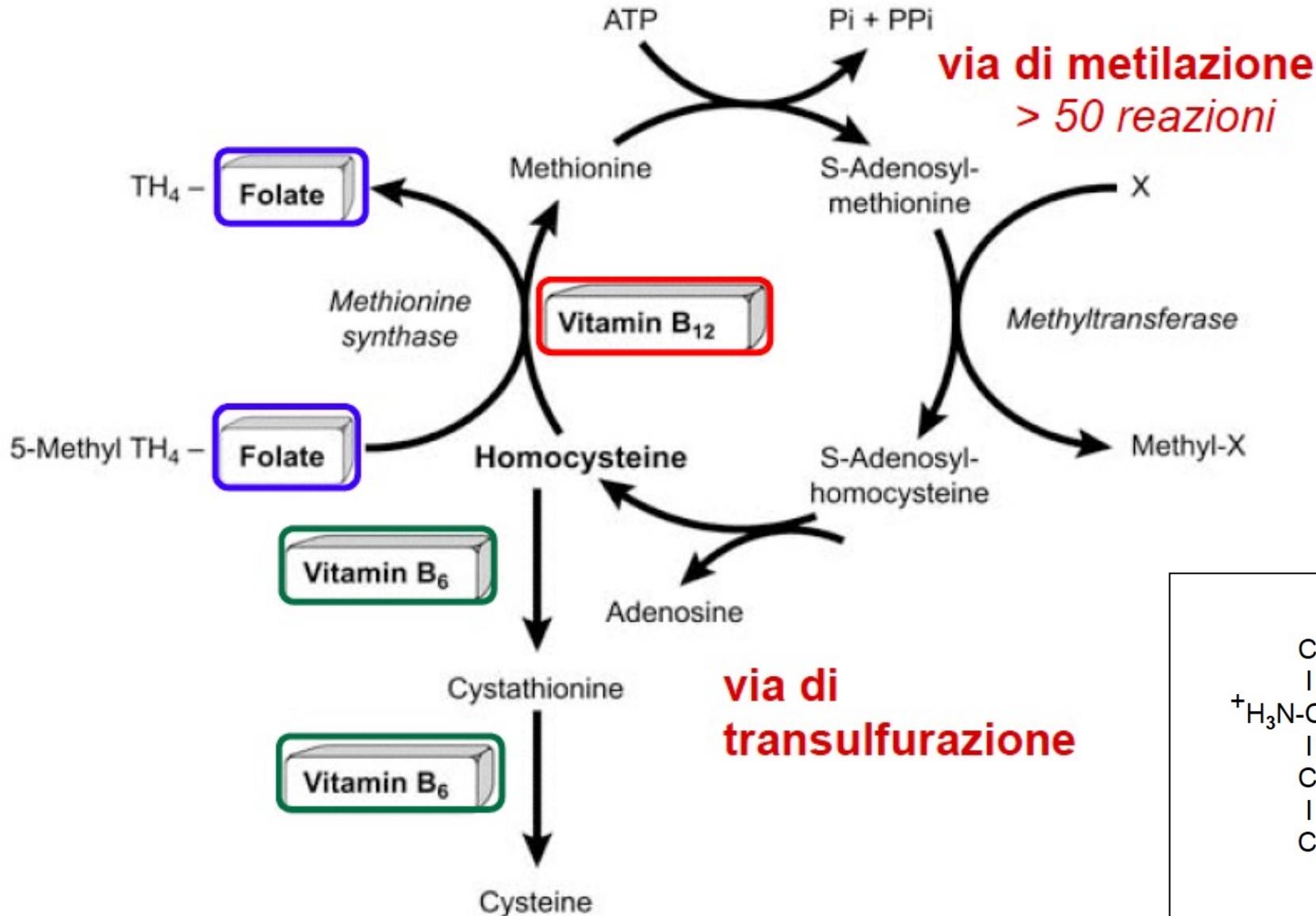
### 5 mutazioni più frequenti nelle LAM:



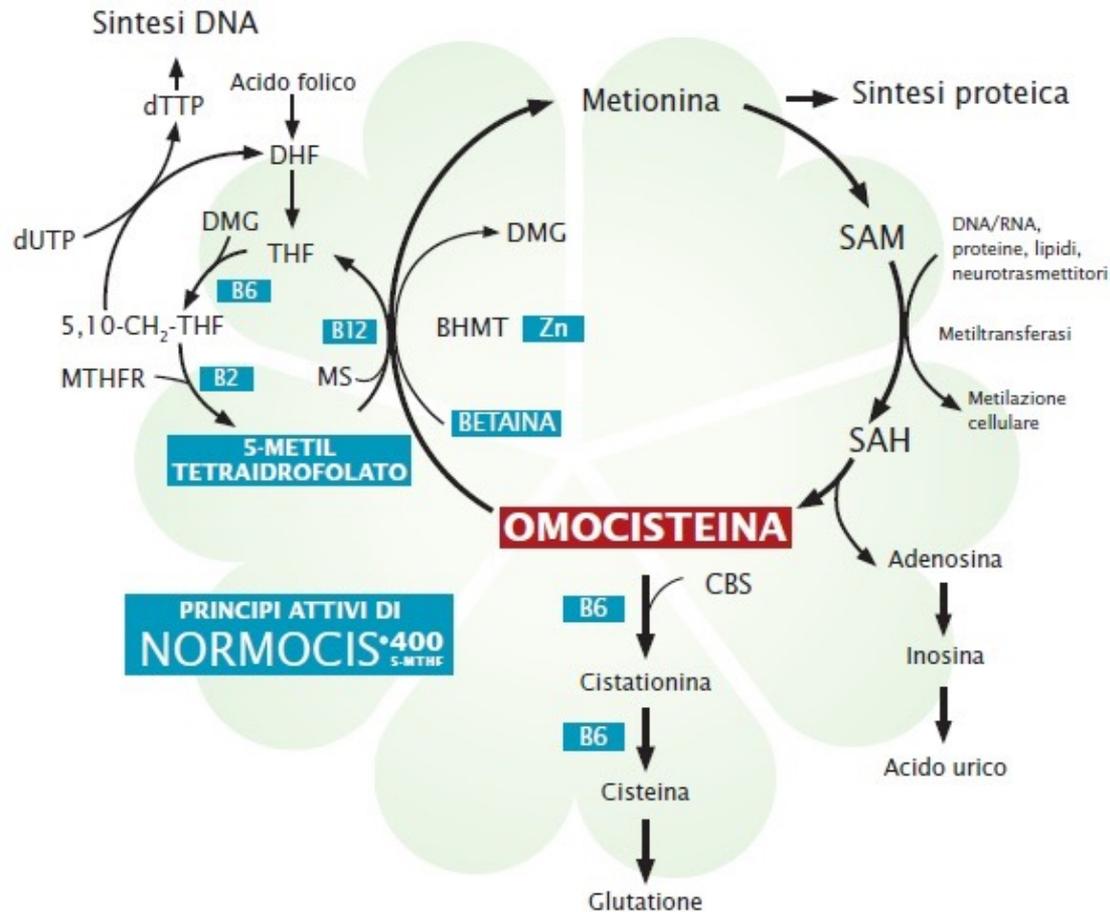
| Gene  | Sample Number | Positive Samples | Percent Mutated |
|-------|---------------|------------------|-----------------|
| NPM1  | 4085          | 1337             | 32%             |
| FLT3  | 15681         | 3774             | 24%             |
| NRAS  | 2371          | 377              | 15%             |
| CEBPA | 1937          | 349              | 18%             |
| KIT   | 2767          | 133              | 4%              |



# Metabolismo dell'unità monocarboniosa



metionina Met



**THF** tetraidrofolato  
**MTHFR** metil-tetraidrofolato-reduttasi  
**5,10-CH<sub>2</sub>-THF** metilentetraidrofolato  
**BHMT** betaina-omocisteina-metiltransferasi  
**CBS** cistationin-beta-sintetasi  
**SAM** s-adenosil metionina  
**SAH** s-adenosil-omocisteina  
**MS** metionin sintetasi-reduttasi

# METIL TRANSFERASI

## Enzimi specifici per l'acceptore del metile

metile utilizzato per la sintesi di una grande varietà di composti

---

- **Creatina** (quantitativamente la più importante)
- **Colina**
  - **fosfolipidi** (membrane cellulari, VLDL, segnali lipidici)
  - **neurotrasmettitori** (acetilcolina)
- **Carnitina**
- **Adrenalina**
- **RNA, DNA**

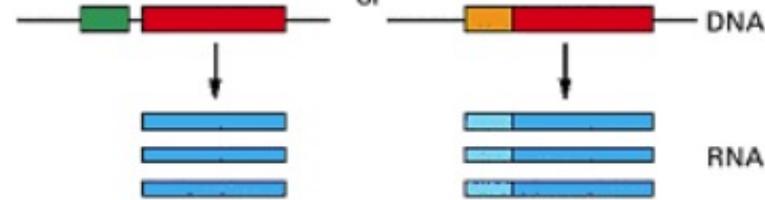
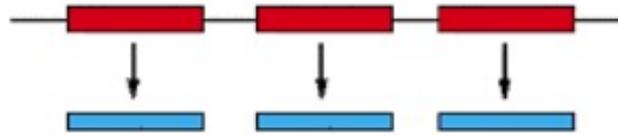
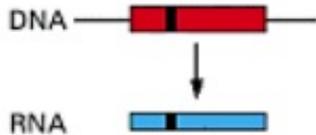
La metilazione del DNA rappresenta un meccanismo di controllo dell'espressione genica che qualora alterato può avere un importante impatto nella embriogenesi

proto-oncogene

DELETION OR POINT MUTATION  
IN CODING SEQUENCE

GENE AMPLIFICATION

CHROMOSOME REARRANGEMENT



➤ Viene prodotta  
una proteina  
costituzionalment  
e attiva

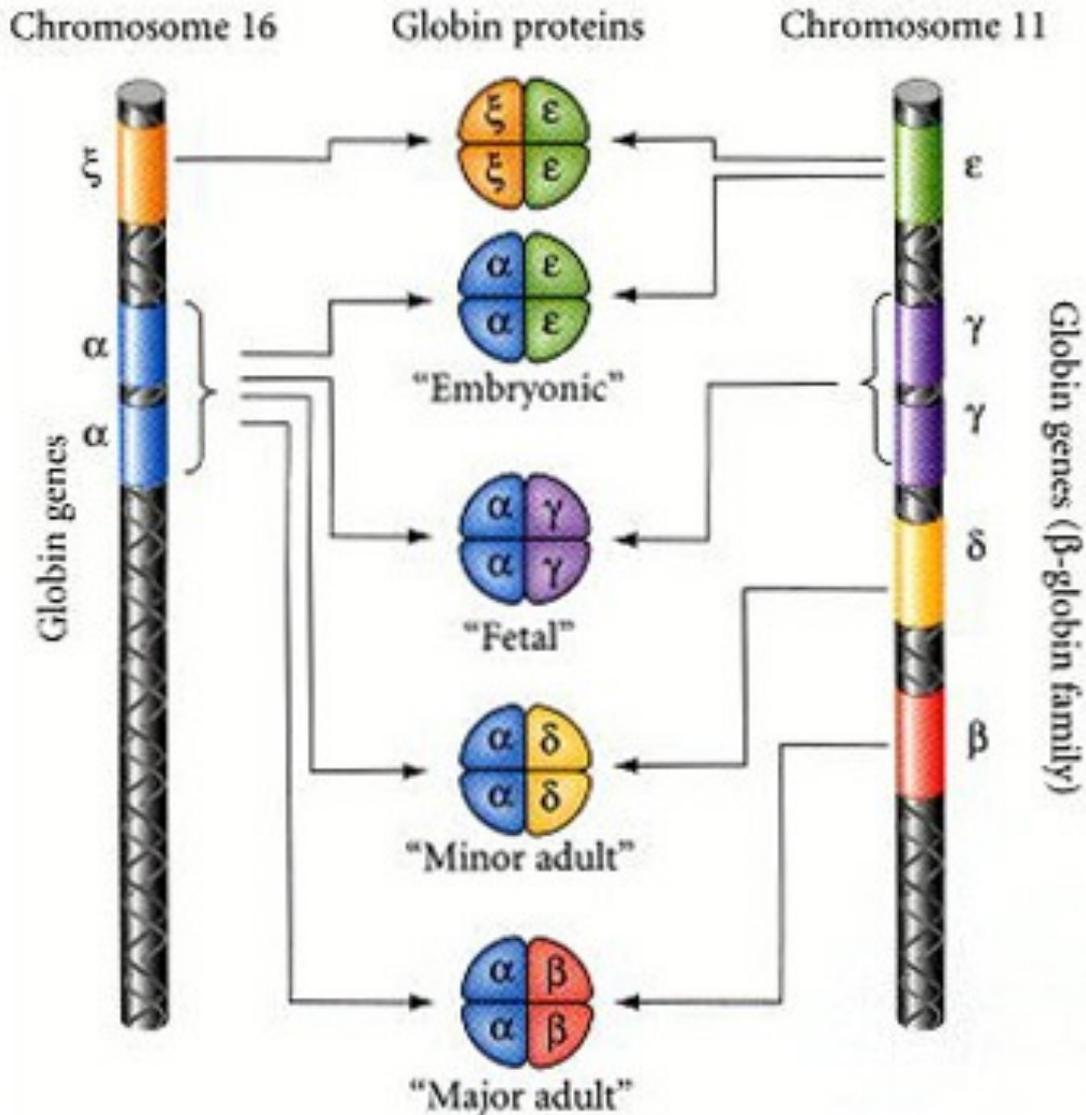
➤ Viene prodotta  
una proteina  
normale ma in  
quantità molto  
maggiore

➤ Viene prodotta  
una proteina  
normale ma in  
quantità molto  
maggiore

➤ Viene  
prodotta  
una  
proteina  
alterata  
iperattiva

Si forma un GENE  
DI FUSIONE

# LE EMOGLOBINE E LE EMOGLOBINOPATIE

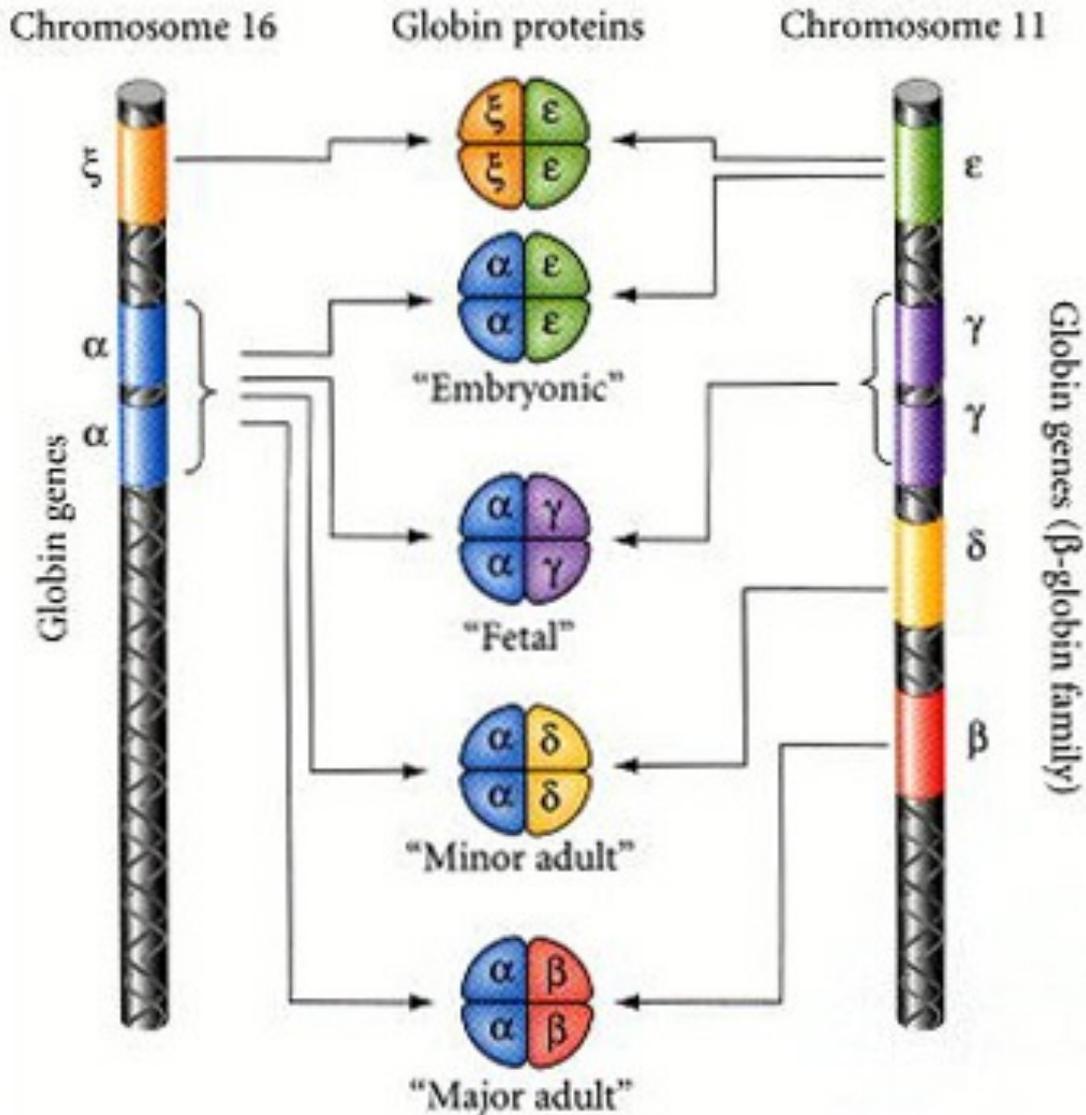


Nell'adulto, il 96% è HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ),

il 3% è HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ )

e l'1% è emoglobina fetale HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ).

# LE EMOGLOBINE E LE EMOGLOBINOPATIE



Nell'adulto, il 96% è HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ),  
 il 3% è HbA2 ( $\alpha_2\delta_2$ )  
 e l'1% è emoglobina fetale HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ).

# ANEMIE DA PERDITA ECCESSIVA DI ERITROCITI

## ANEMIA FALCIFORME

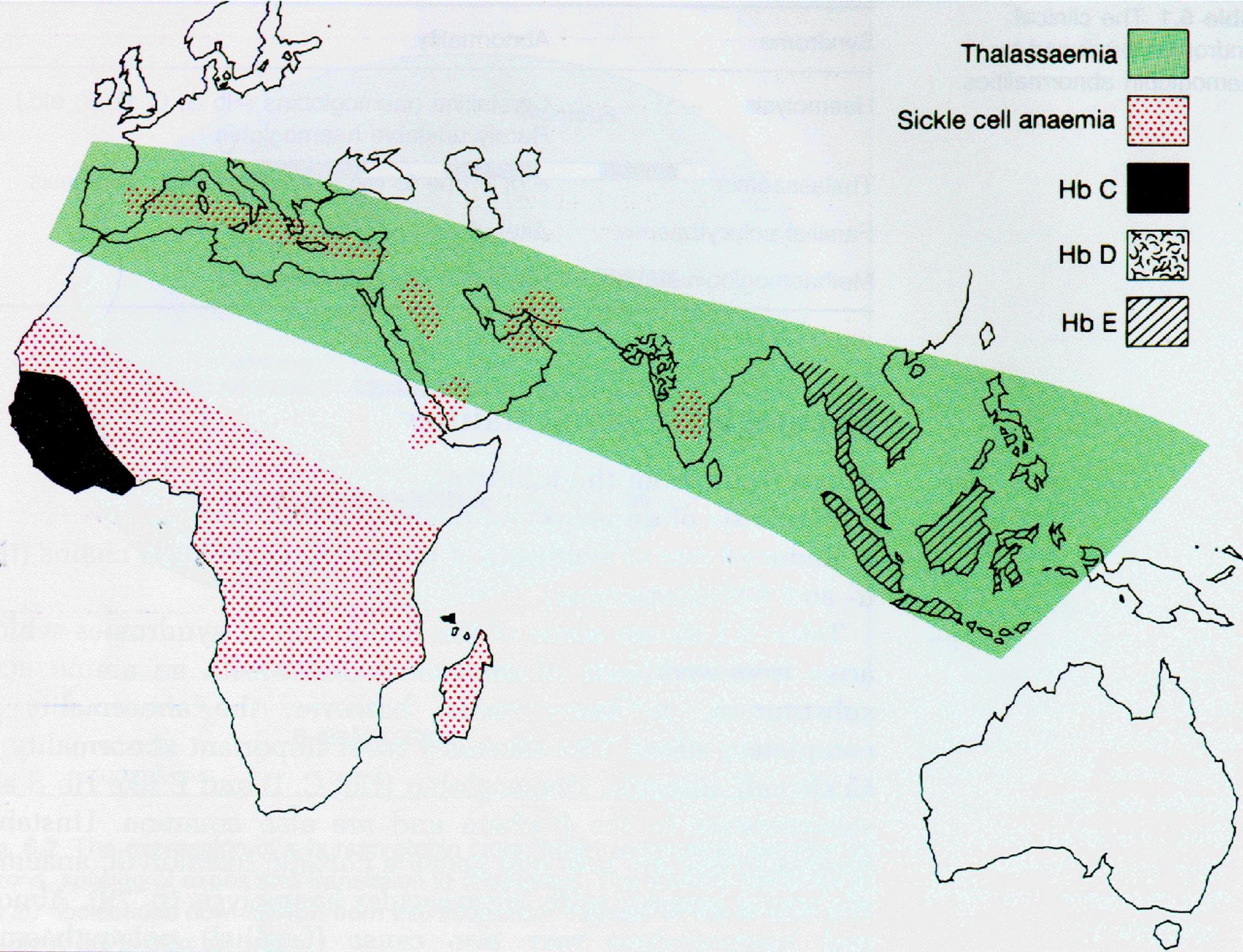
Malattia autosomica recessiva

E' particolarmente comune tra le popolazioni i cui antenati provengono dall'Africa sub-Sahariana; dal centro e sud America; dall'Arabia Saudita; dall'India e dai paesi mediterranei, come Turchia, Grecia e Italia.

1/700 neri americani è affetto

Nei paesi dove la malaria è endemica fino al 30% dei neri africani è eterozigote: frequenza correlata alla protezione che la HbS fornisce nei confronti del *Plasmodium falciparum*, agente eziologico della malaria.

**Difetto molecolare: HbS ( $\beta_6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ )  $\rightarrow$  alterazione delle proprietà chimico-fisiche dell'Hb**



Thalassaemia



Sickle cell anaemia



Hb C

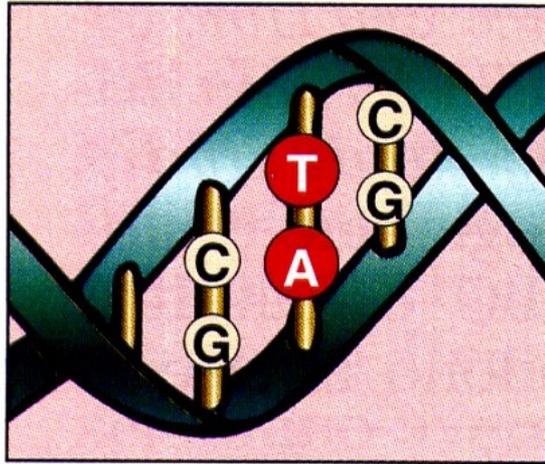


Hb D

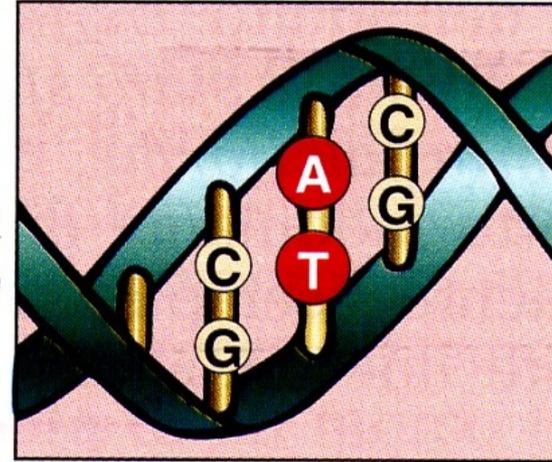


Hb E





Mutazione  
puntiforme



HbA



Acido  
glutammico

**POLARE**

HbS

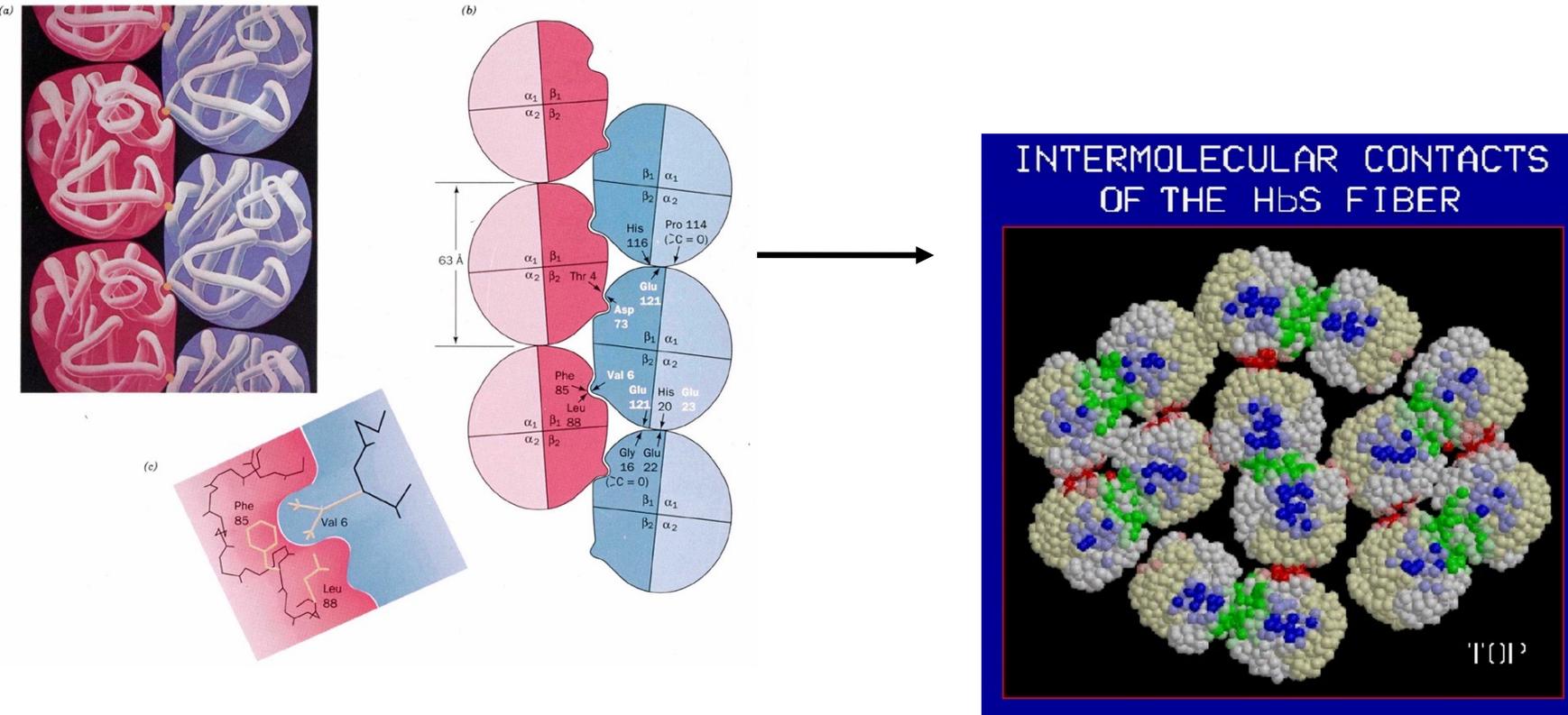


Valina

**APOLARE**

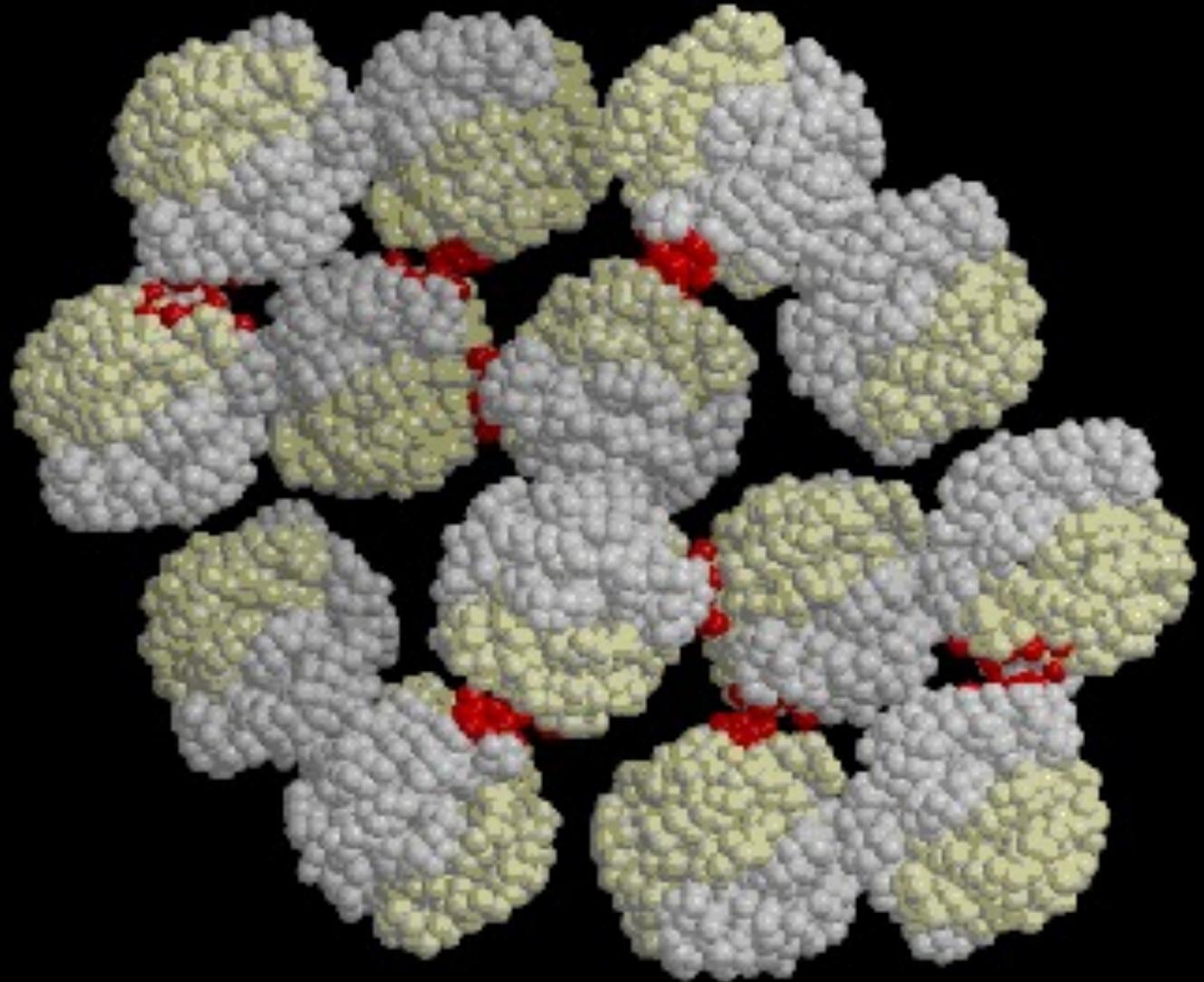
In condizioni di bassa tensione di ossigeno, l'esposizione della valina in posizione 6 sulla catena  $\beta$ -globinica, favorisce l'aggregazione delle molecole e la loro polimerizzazione.

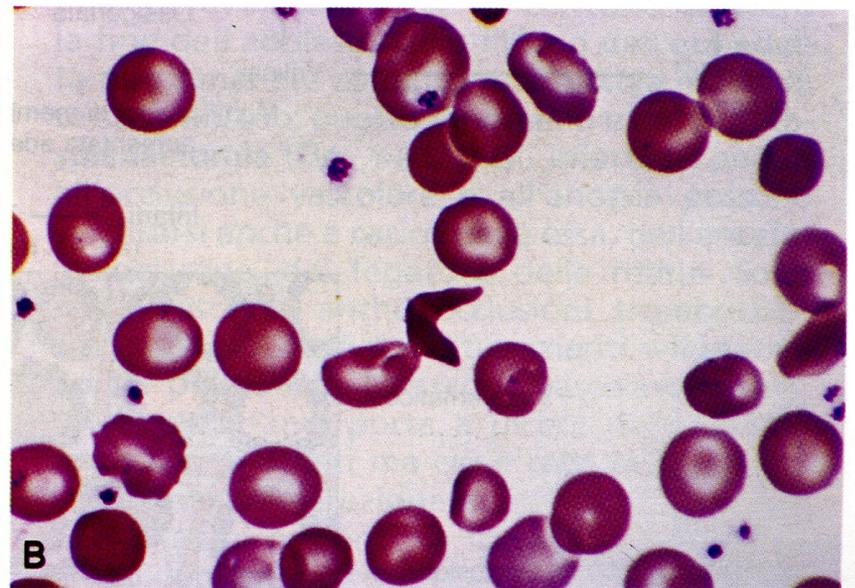
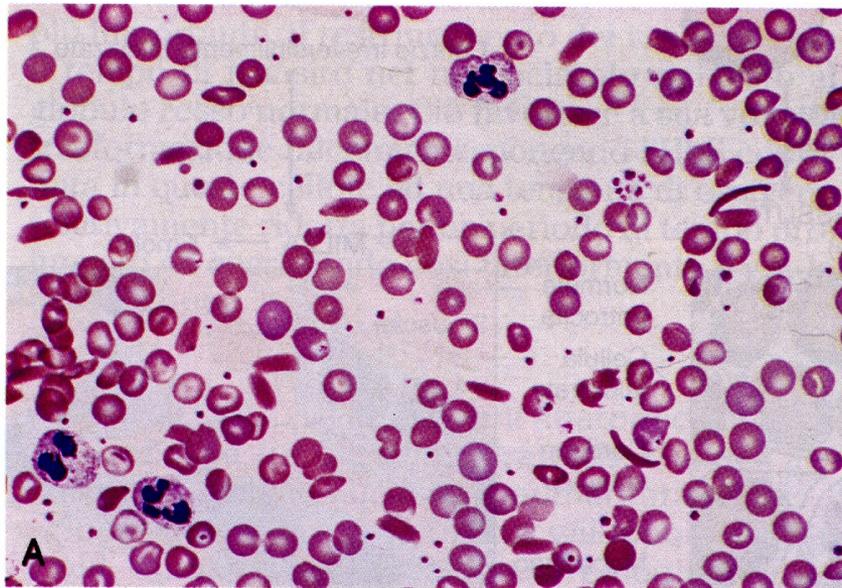
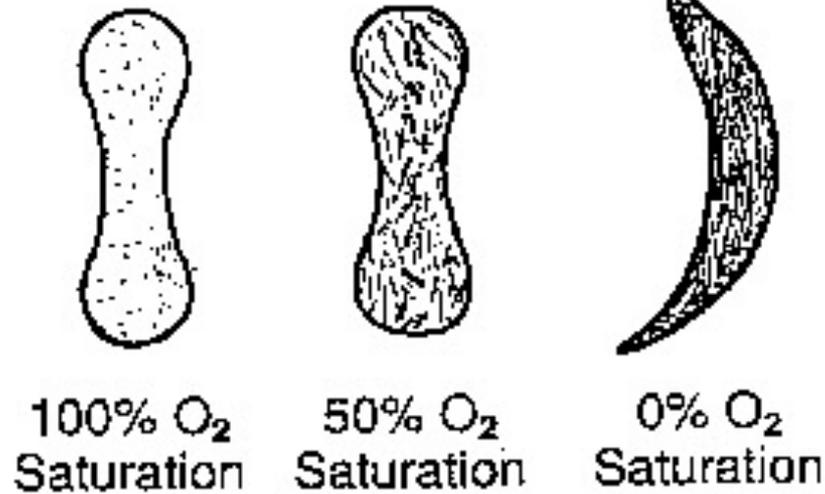
## Sickle cell Hb



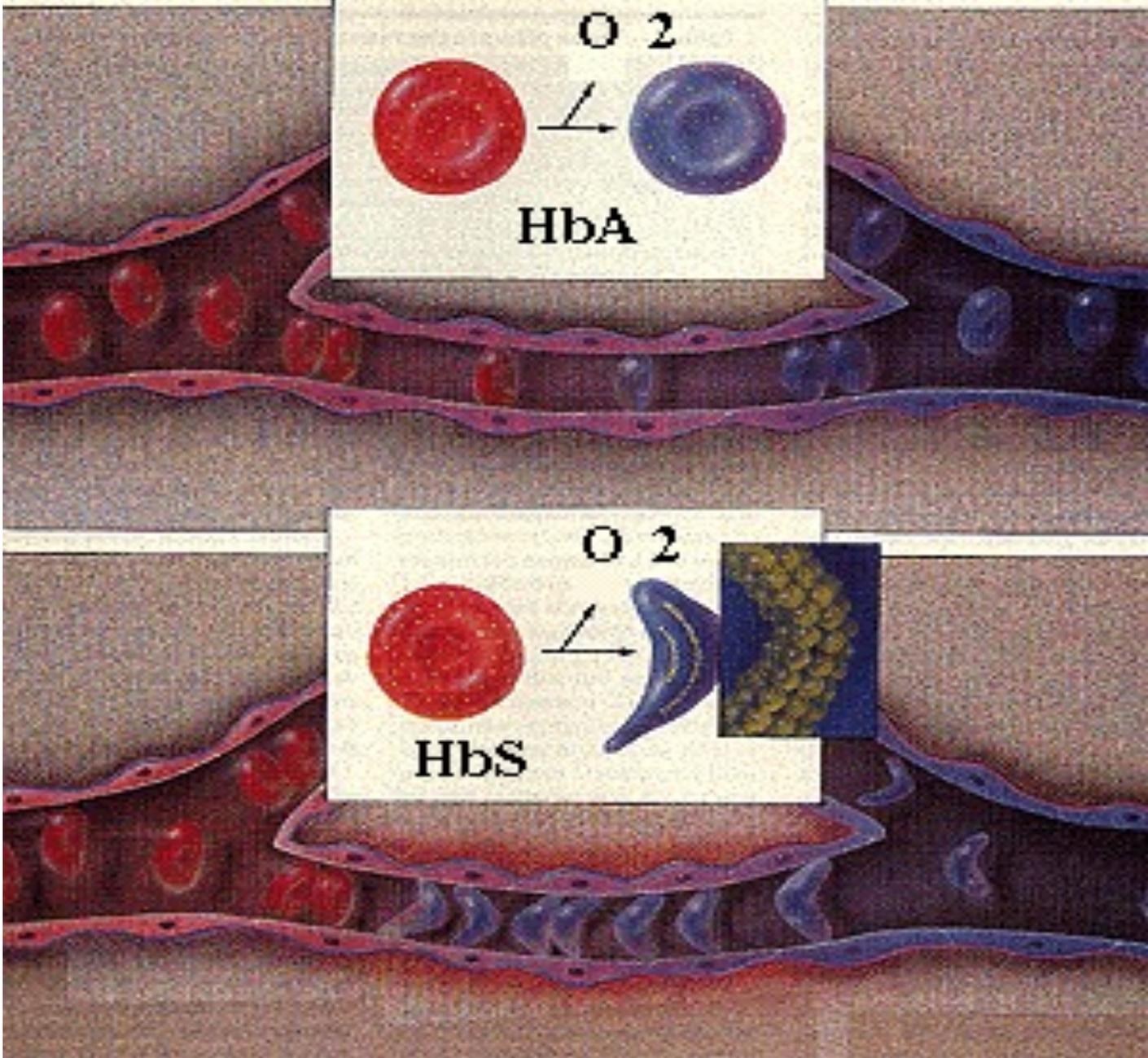
Le fibre di HbS che si formano portano ad una distorsione degli eritrociti che assumono una forma a falce o ad agrifoglio.

**Fibres of  
Sickle  
Hemoglobin  
cross section**





**Figura 14-9.** Striscio di sangue periferico da un paziente con anemia a cellule falciformi. *A*, A piccolo ingrandimento sono presenti cellule falciformi, con anisocitosi e poichilicitosi. *B*, A forte ingrandimento, si osserva al centro una cellula irreversibilmente falcizzata. (Cortesia del Dr. Robert W. McKenna, Department of Pathology, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX.)



La falcizzazione delle emazie è un fenomeno INIZIALMENTE REVERSIBILE: in seguito all'ossigenazione l'HbS torna allo stato depolimerizzato.

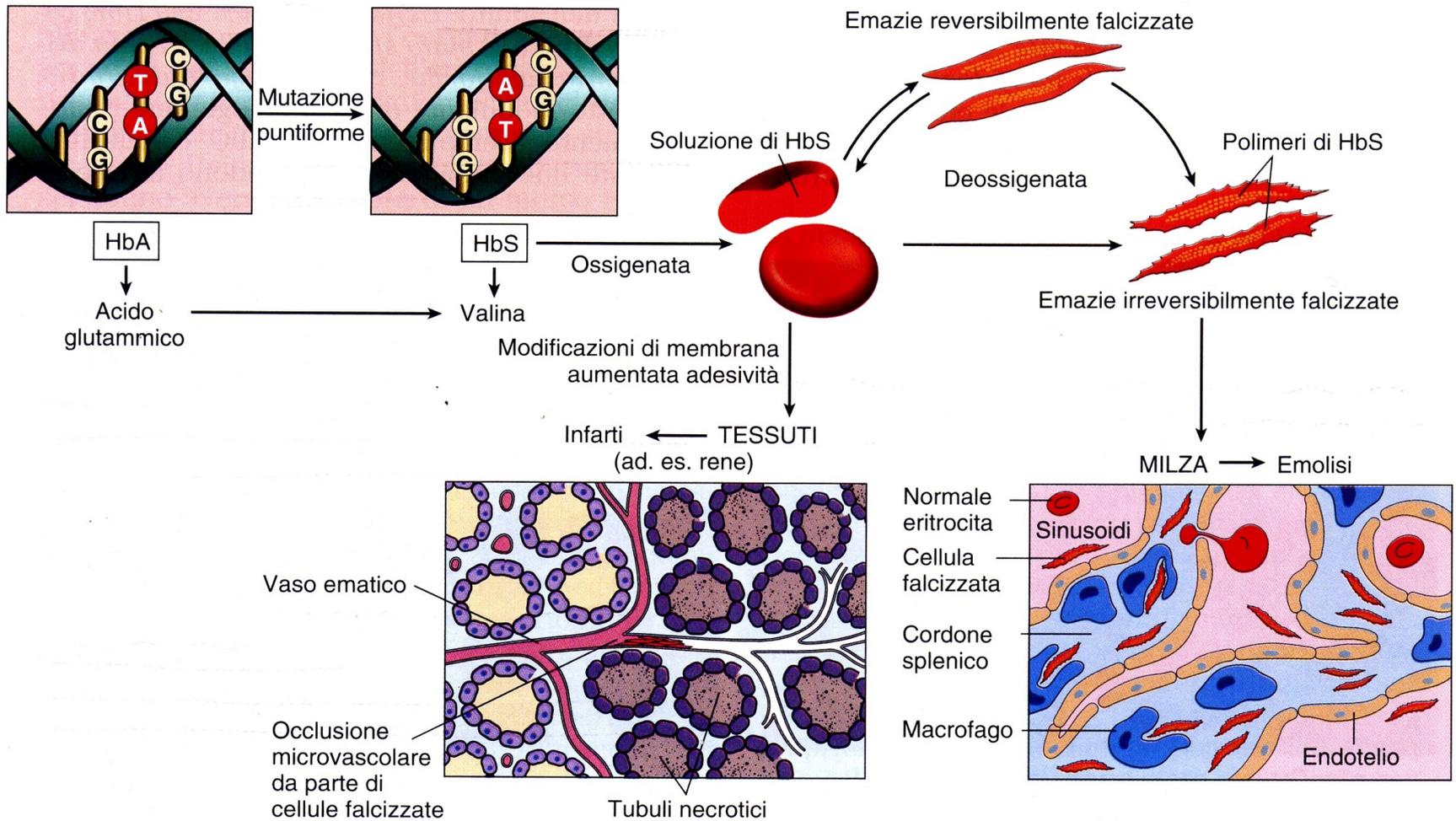
Tuttavia con il ripetersi di episodi di falcizzazione e di ritorno allo stato normale, si verifica un danno di membrana e le cellule vengono irreversibilmente falcizzate.

## CONSEGUENZE

**ANEMIA EMOLITICA CRONICA:** gli eritrociti falcemici non riescono ad uscire e a rientrare nei sinusoidi splenici e quindi sono eliminati dai macrofagi dei cordoni splenici. La vita dell'eritrocita si riduce da 120 a 20 giorni.

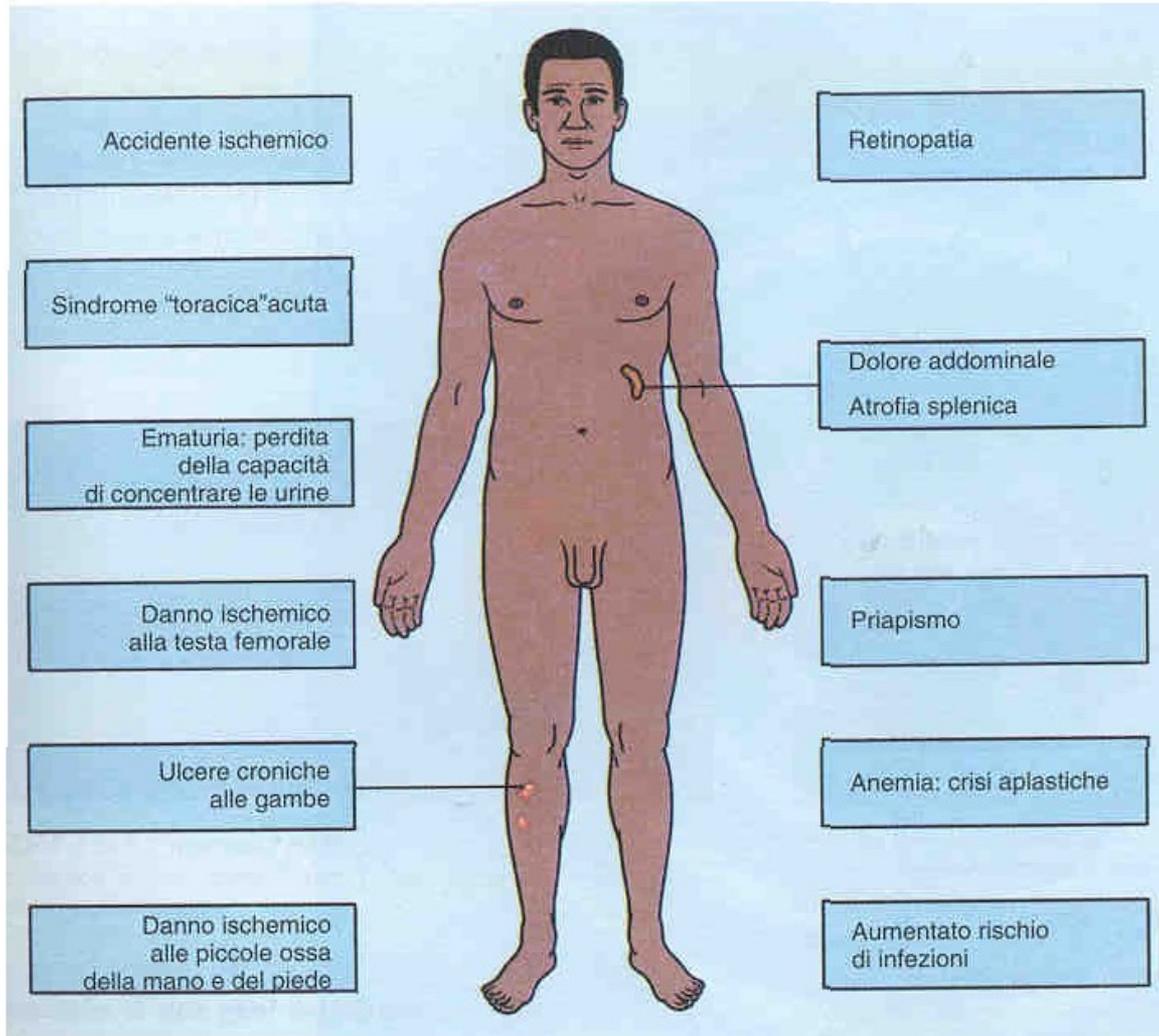
**OCCLUSIONE DEI PICCOLI VASI,** che determina un danno tissutale ischemico. Sembra che responsabili del fenomeno siano cellule con membrana alterata, ma non completamente falcizzate che, presentando un'aumentata tendenza all'adesione all'endotelio, porterebbero al restringimento dei piccoli vasi; successivamente le cellule più rigide, irreversibilmente falcizzate, verrebbero intrappolate occludendo definitivamente il vaso.

Questi effetti si hanno **SEMPRE** nell'omozigote; nell'eterozigote (che si dice portatore del **TRATTO FALCEMICO**) solo in caso di grave ipossia.



**Figura 14-10.** Fisiopatologia e conseguenze morfologiche dell'anemia a cellule falciformi.

# QUADRO CLINICO



Da ischemia del sistema nervoso centrale

Dolore toracico e dispnea da occlusione del microcircolo polmonare

Da deficit funzionale del rene causato da ischemia

Da ristagno vascolare nei tessuti sottocutanei

Da ischemia retinica

Da infarto o trombosi della milza per eritrostasi. Sostituzione con materiale fibroso

Da congestione vascolare del pene

Cessazione dell'attività midollare per infezioni da parvovirus

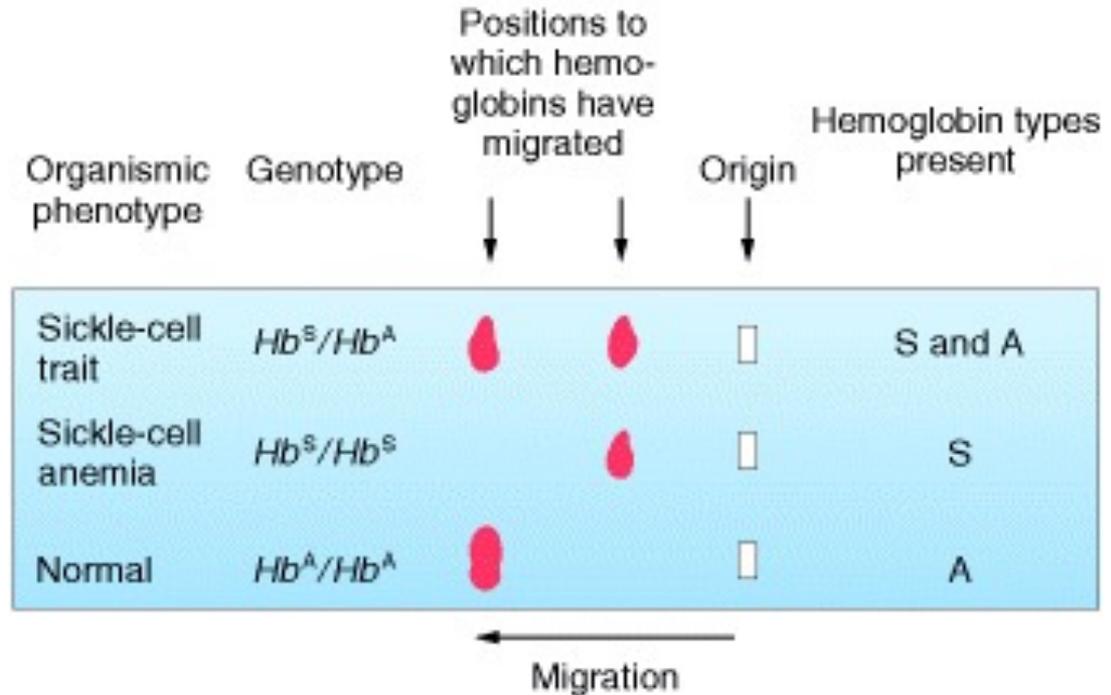
Consequente all'atrofia della milza

## DIAGNOSI

### -STRISCIO DI SANGUE

spesso il preparato si fa dopo aver mescolato il sangue con un reagente che consumi ossigeno (es. metabisolfito) per indurre la falcizzazione

### -ELETTROFORESI



## TERAPIA

-**Trattamento con IDROSSIUREA:** determina un forte aumento della concentrazione di HbF nelle emazie riducendo la frequenza delle crisi vaso-occlusive.

**Il 90% dei pazienti raggiunge i 20 anni e quasi il 50% sopravvive oltre ai 50**

# TAPPE PER DEFINIRE IL TIPO DI EMOGLOBINOPATIA

## ✓ Indagini ematochimiche di base

- *Emocromo completo, morfologia emazie*
- *Conta reticulocitaria*
- *Parametri del ricambio marziale*
- *Indici indiretti di emolisi*
- *Assetto emoglobinico*

## ✓ Valutazione clinica

## ✓ Studio familiare

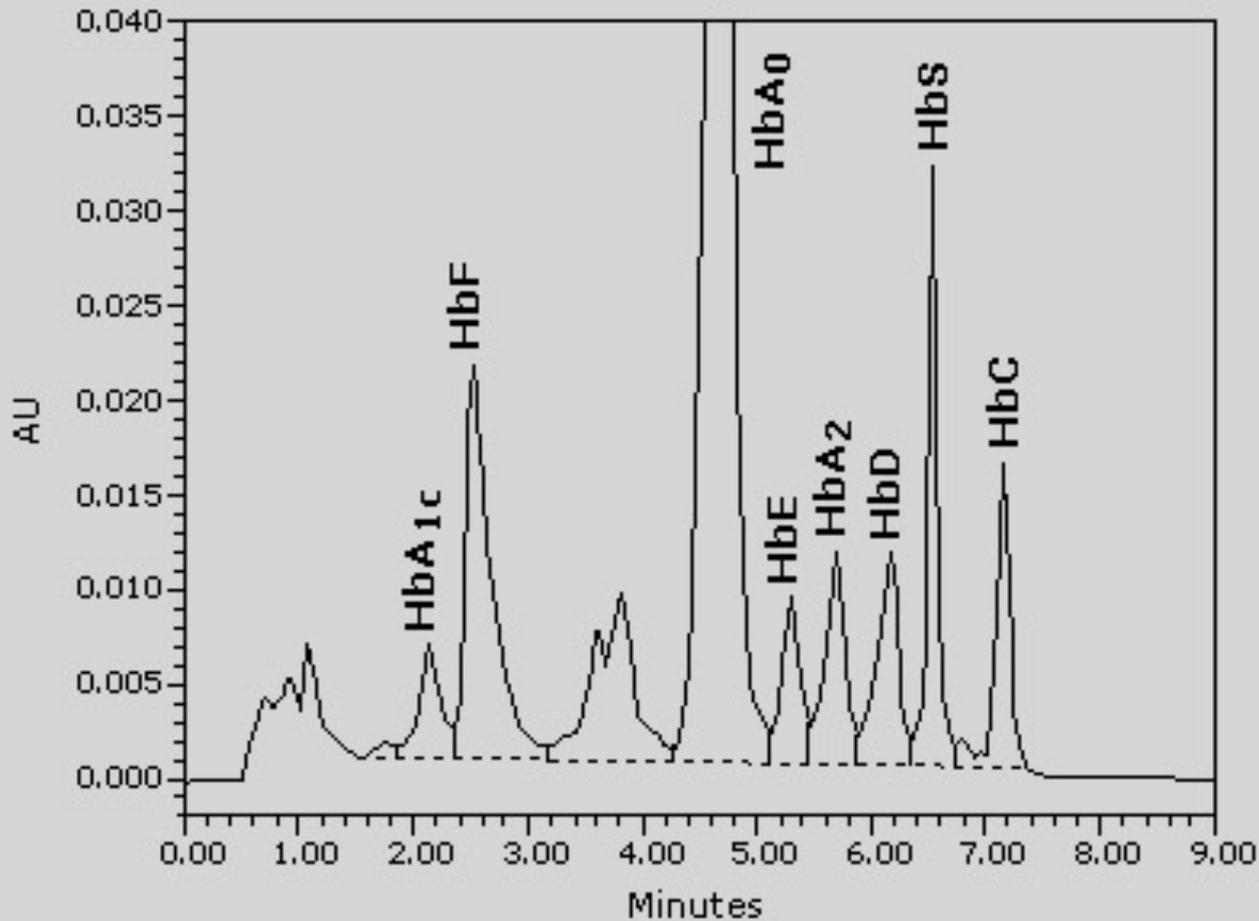
## ✓ Indagini di II livello per definire quadri complessi

I reticulociti sono **bassi** nelle anemie da **alterata produzione eritrocitaria** e **alti** nelle anemie da **aumentata distruzione degli eritrociti**

# DETERMINAZIONE DELL'ASSETTO EMOGLOBINICO

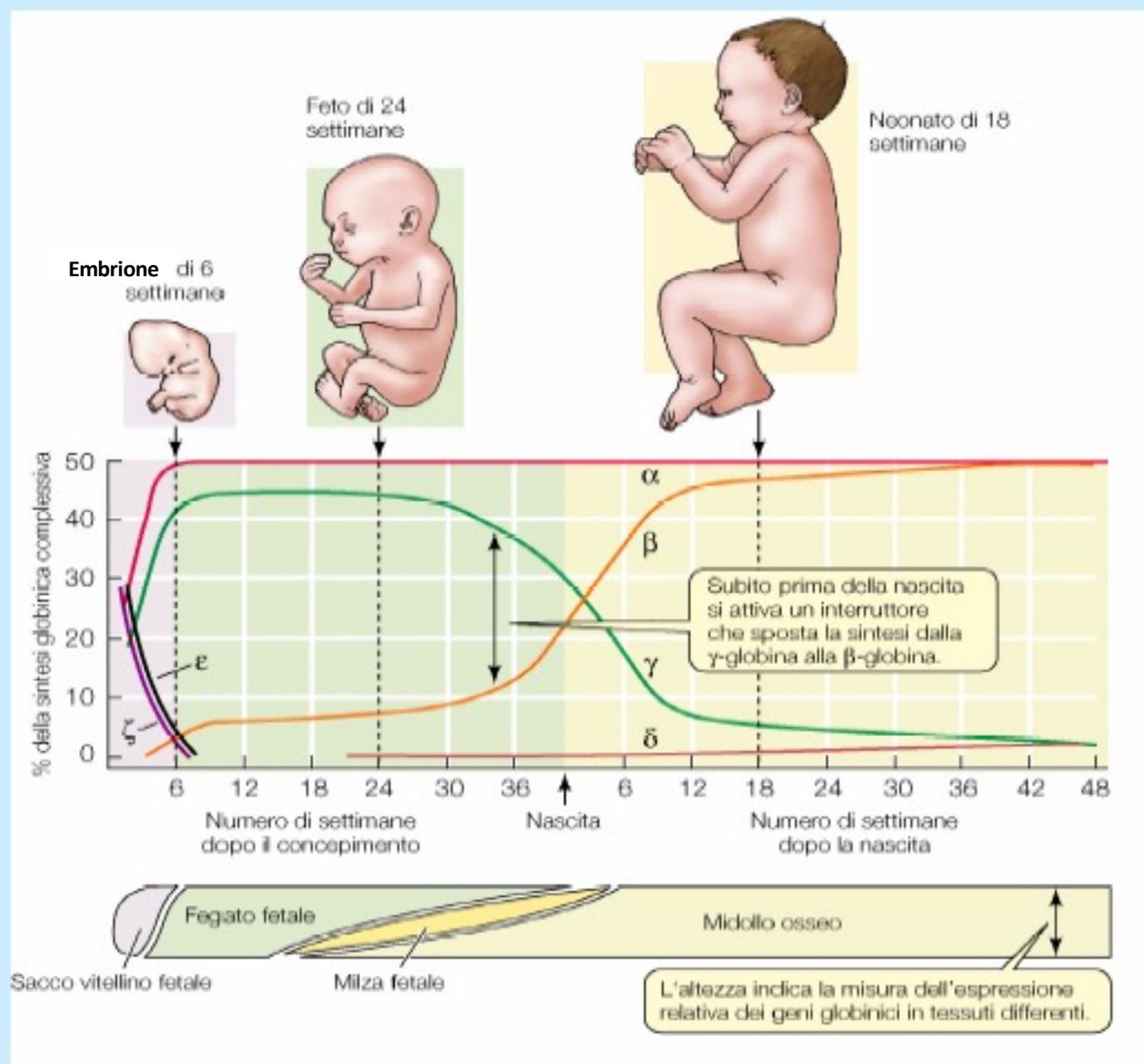
HPLC (High pressure liquid chromatography)

- **Accurata**
- **Precisa**
- **Dosaggio quali-quantitativo**
- **Rileva anche varianti**
- **Sistemi dedicati, veloci, automatizzati**
- **Utilizzo di calibratori e controlli**



**HbA1c= emoglobina glicata. La sua concentrazione è alta nei pazienti diabetici**

**HbE, HbD, HbC= varianti dell'emoglobina che risultano da singole mutazioni nel gene della beta globina.**



## SINDROMI TALASSEMICHE

Gruppo di disordini ereditari nei quali alterazioni genetiche eterogenee determinano l'**ABOLIZIONE** o la **RIDUZIONE** della sintesi di una o più catene globiniche.

### CONSEGUENZE:

a) ridotta formazione di emoglobina con conseguente marcata anemia microcitica ipocromica.

b) presenza di catene globiniche in eccesso libere che, non potendo formare emoglobina nella sua conformazione tetrameric, tendono a precipitare nella cellula (es.  $\beta$ -talassemia) oppure tendono ad aggregare spontaneamente dando luogo a tetrameri anomali (es. tetramero  $\beta_4$  nell' $\alpha$ -talassemia). Nel primo caso gli eritrociti muoiono già a livello di eritroblasto nel midollo osseo; nel secondo caso arrivano a maturazione ma poi si verifica emolisi per precipitazione dei tetrameri → **GRAVE ANEMIA**

Le talassemie costituiscono uno dei disordini genetici più diffusi nel mondo con un numero stimato di portatori superiore a 270 milioni e più di 350.000 persone affette; ne risultano particolarmente colpite le popolazioni del bacino del Mediterraneo, dell'Africa, dell'India e dell'Oriente. In Italia prevalgono le forme di  $\beta$ -talassemia, che risulta endemica nel delta padano, in Puglia, Calabria, Sicilia e Sardegna.

## ANEMIE DA ALTERATA PRODUZIONE ERITROCITARIA

### $\beta$ -TALASSEMIE

Assente o ridotta sintesi di catene  $\beta$  conseguente a mutazioni -per lo più puntiformi- o, meno frequentemente, a delezione genica

**$\beta^0$ -TALASSEMIA:** assenza completa di catene  $\beta$  globiniche negli omozigoti.

**$\beta^+$ -TALASSEMIA:** ridotta sintesi della  $\beta$  globina negli omozigoti.

## MUTAZIONI RESPONSABILI DELLA $\beta$ -TALASSEMIA E RELATIVO FENOTIPO

-Mutazioni puntiformi non-senso o frame-shift (formazione di un codone di stop che causa l'arresto della traduzione dell'RNA messaggero oppure inserzione o delezione di uno o più nucleotidi con conseguente frame-shift):  $\beta^0$ -talassemia.

-Mutazioni di sequenze introniche con conseguenti alterazioni nel normale processo di splicing dei messaggeri:  $\beta^+$  e  $\beta^0$ -talassemia.

-Mutazioni delle sequenze promoter (riduzione della velocità di trascrizione):  $\beta^+$ -talassemia.

-Delezioni geni globinici (rare):  $\beta^0$ -talassemia.

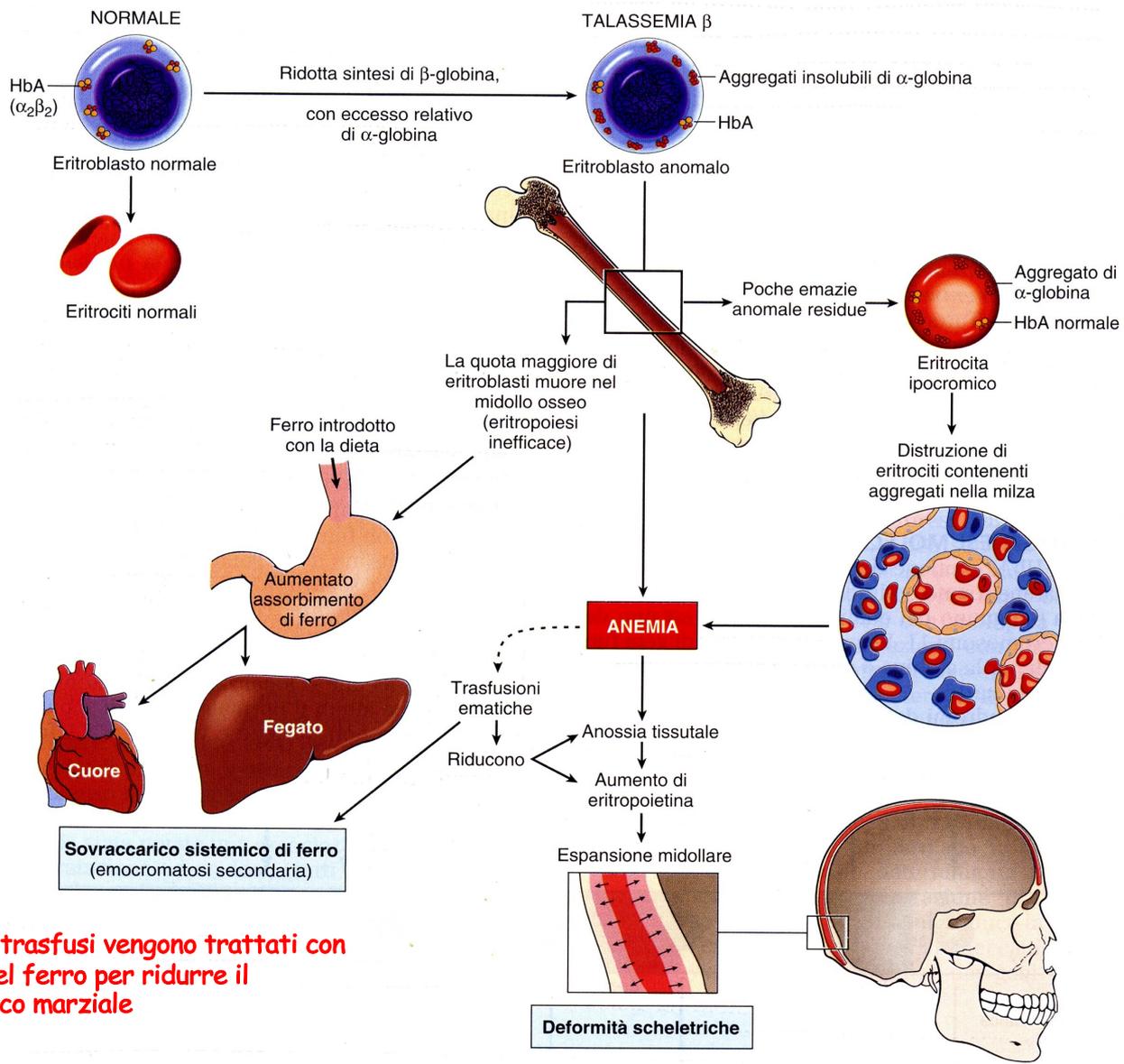
## $\beta$ -TALASSEMIA MAJOR o MORBO DI COOLEY o ANEMIA MEDITERRANEA

Genotipo:  $\beta^+/\beta^+$  o  $\beta^0/\beta^0$ .

E' la più comune forma talassemica nei paesi mediterranei ed in alcune parti dell'Africa e del sud-est asiatico.

Quadro clinico: anemia grave che si manifesta 6-9 mesi dopo la nascita quando HbF viene quasi totalmente sostituita da HbA.

Striscio di sangue con cellule microcitiche e ipocromiche.



**I pazienti trasfusi vengono trattati con chelanti del ferro per ridurre il sovraccarico marziale**

**Figura 14-14.** Patogenesi della  $\beta$ -talassemia major. Da notare che gli aggregati di  $\alpha$ -globine in eccesso non sono visibili negli strisci ematici di routine. Le trasfusioni ematiche, da un lato, correggono l'anemia e riducono lo stimolo alla secrezione di eritropoietina e le alterazioni indotte dall'espansione midollare; dall'altro, aumentano il sovraccarico sistemico di ferro.

Alterazioni ossee da espansione del midollo; neoformazione ossea del cranio: cranio a spazzola

Eccessivo accumulo di ferro da trasfusioni e da aumentato assorbimento intestinale in seguito alla eritropoiesi inefficace.

Espansione midollare conseguente all'aumentata produzione di eritropoietina che provoca l'espansione degli elementi eritroidi nel midollo osseo e in sedi extramidollari

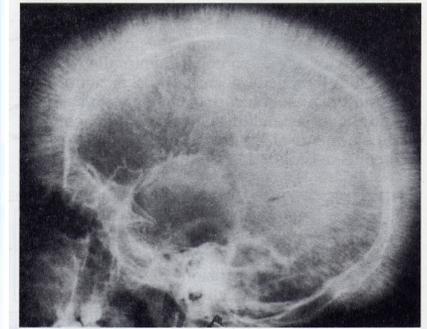
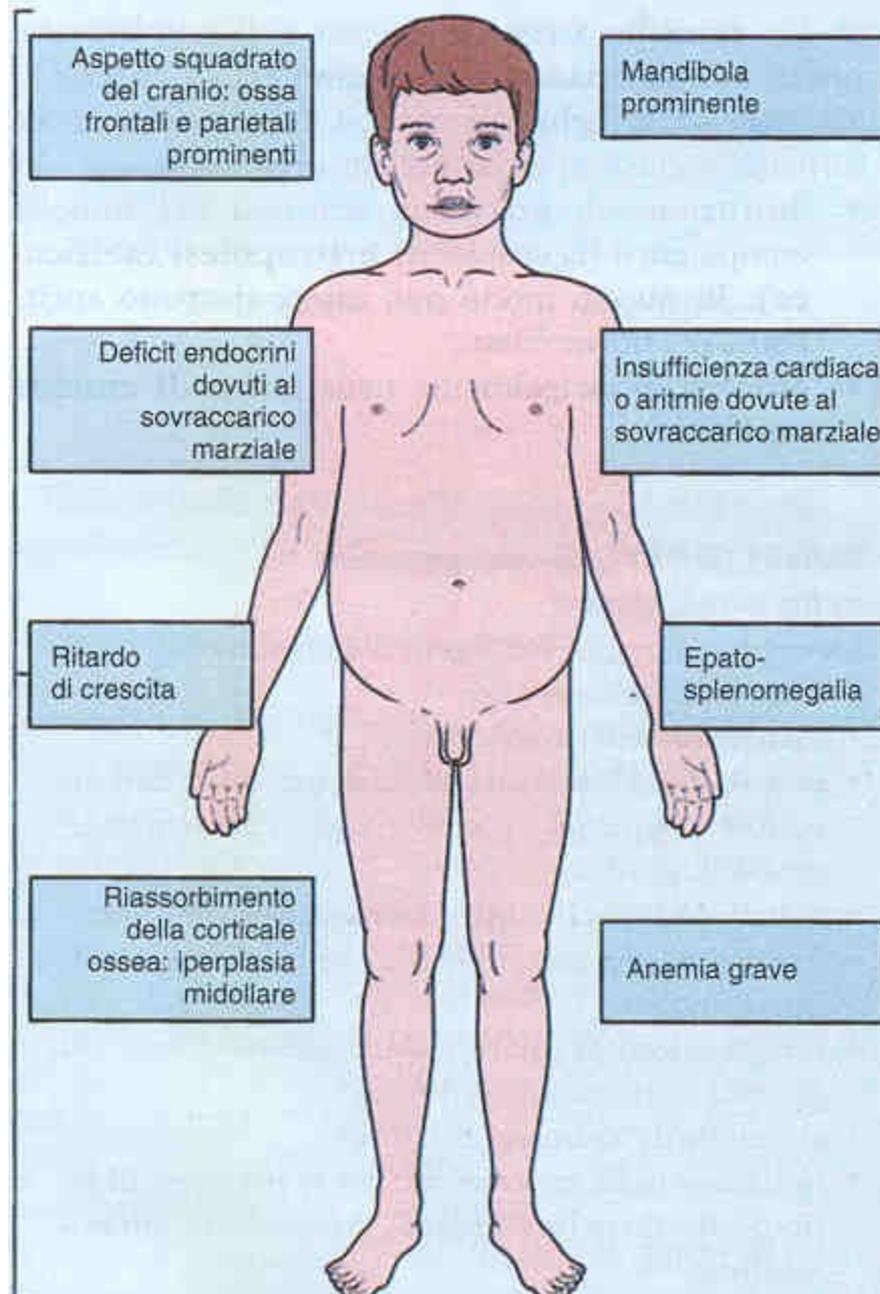
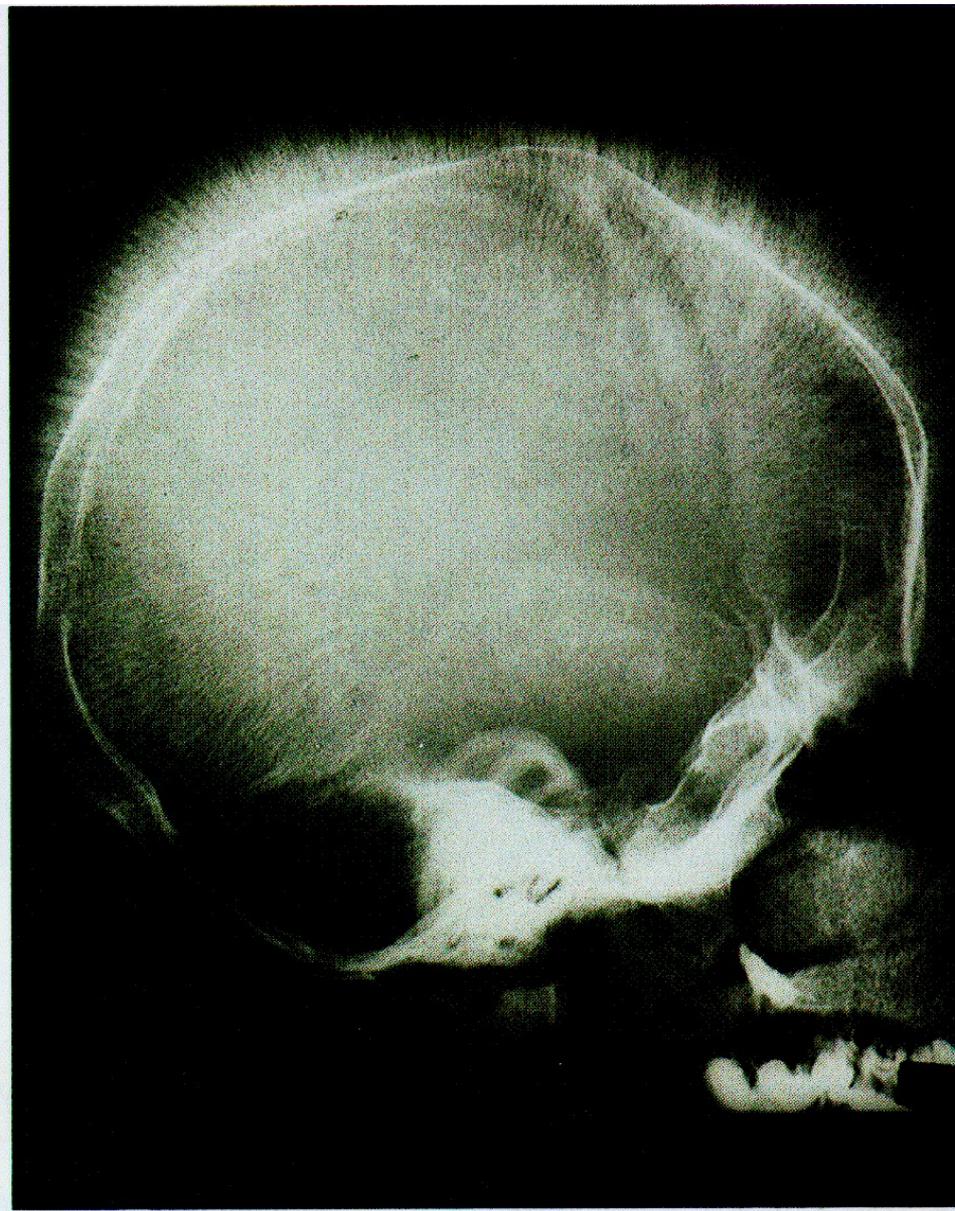


Figura 14-15. Talassemia: radiografia del cranio che mostra neoformazione ossea sul tavolo esterno, con produzione di spicole radiali perpendicolari indicate come "cranio a spazzola". (Cortesia del Dr. Jack Reynolds, Department of Radiology, University of Texas Southwestern Medical School, Dallas, TX.)

Da eritropoiesi extramidollare e da eritrofagocitosi



# CLINICA DEL MORBO DI COOLEY



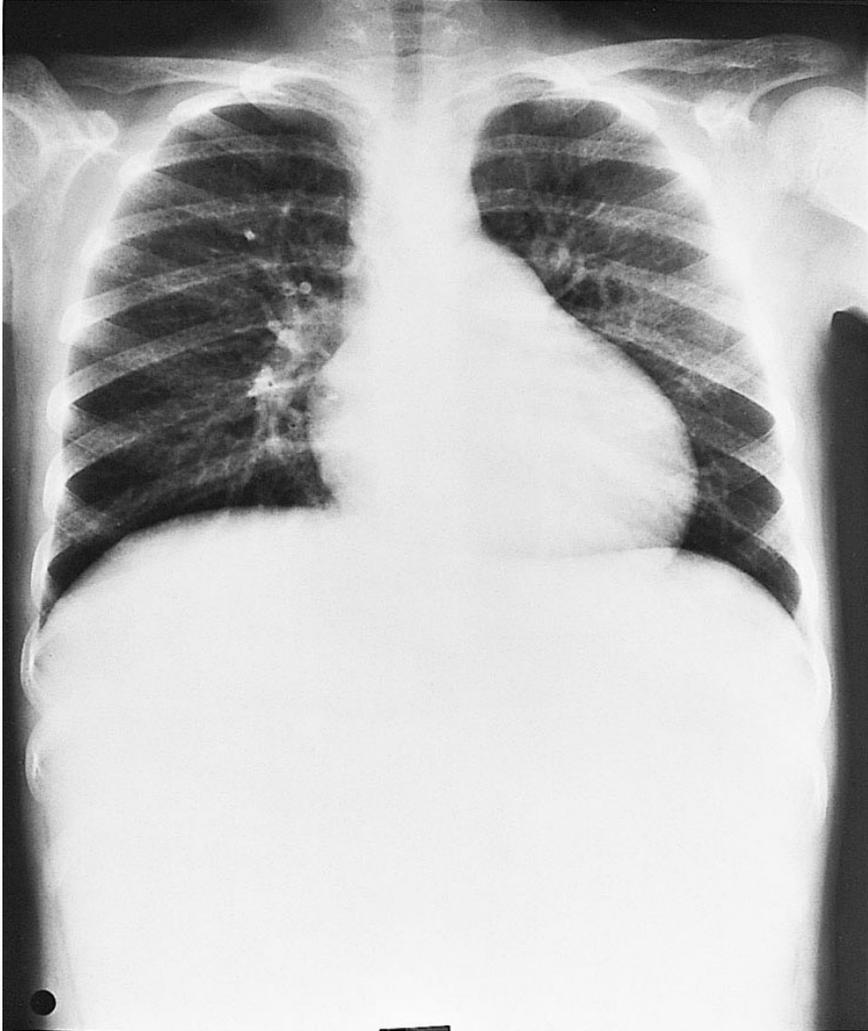
Protrusione dei denti per  
deformità delle ossa

# CLINICA DEL MORBO DI COOLEY

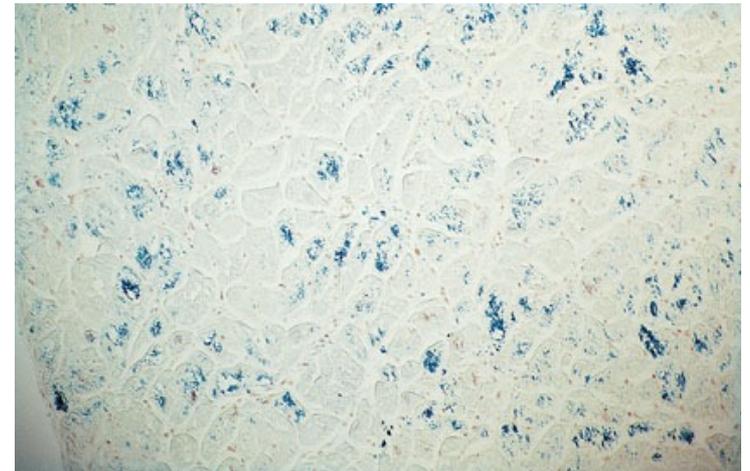
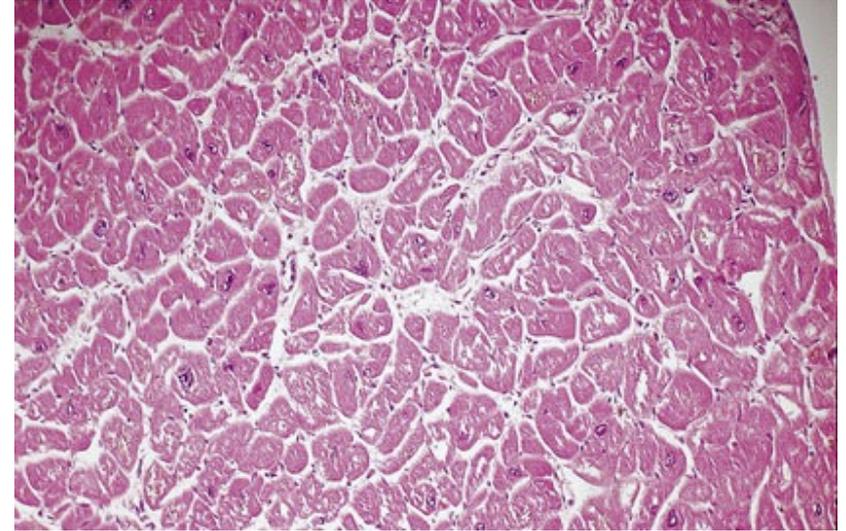


**Epato-splenomegalia ingravescenti**

# CLINICA DEL MORBO DI COOLEY



**Cardiomegalia in paziente con Morbo di Cooley e sovraccarico marziale**



**Sezioni post mortem di miocardio con depositi di ferro (emosiderina rivelata con Blu di Prussia)**

## $\beta$ -TALASSEMIA MINOR

Genotipo:  $\beta^+/\beta$  o  $\beta^0/\beta$ .

Colpisce i medesimi gruppi etnici della talassemia major. In Italia molto frequente in Italia meridionale, isole e delta del Po.

La maggiore resistenza degli eterozigoti all'infezione sostenuta dai parassiti malarici ha giocato un ruolo importante nell'affermarsi di questa patologia in determinate aree geografiche.

Quadro clinico: condizione asintomatica, lieve anemia con cellule ipocromiche. Incremento della frazione di HbA2 a valori del 3,5-7%.

# FENOTIPI NELLA $\beta$ -TALASSEMIA

| Malattia clinica    | Catene globiniche presenti                                 | Caratteristiche   |
|---------------------|--|---|
| $\beta$ -talassemia |  |   |
| Talassemia maior    | Omozigosi $\beta^0/\beta^0$<br>Omozigosi $\beta^+/\beta^+$ | Anemia microcitica ipocromica, emolisi grave, epatosplenomegalia, iperplasia midollare che provoca deformità dello scheletro. Si determina sovraccarico di ferro da ripetute trasfusioni. |
| Talassemia minor    | Eterozigosi $\beta^+/\beta$<br>Eterozigosi $\beta^0/\beta$ | Modesta riduzione di H $\beta$ A, aumento di H $\beta$ A <sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ). Lieve anemia con cellule ipocromiche  |

## $\beta$ -TALASSEMIA: alterazioni ematologiche

|                               | <b>ETEROZ.</b>     | <b>OMOZ.</b> |
|-------------------------------|--------------------|--------------|
| Anemia ipocromica microcitica | lieve              | grave        |
| - Hb, g/dL                    | ↓ (11-14)          | ↓↓↓ (< 7)    |
| - MCH, pg                     | ↓ (< 25)           | ↓            |
| - <b>MCV, fL</b>              | <b>↓ (&lt; 78)</b> | ↓            |
| - RBC $\times 10^{12}/L$      | ↑ (> 5.5)          | ↓            |
| - <b>Hb A<sub>2</sub>, %</b>  | <b>↑ (4-7)</b>     | =/↑          |
| - Hb F, %                     | ↑/= (1-3)          | ↑↑↑ (60-96)  |
| - reticolociti, /1000         | ↑ (3-10)           |              |
| Anisopoichilocitosi           | +                  | ++           |
| Rapporto $\alpha/\beta$       | 2                  | >>2          |
| Resistenza globulare osmot.   | ↑                  | ↑            |
| RBC $t_{1/2}$ , d             | ↓/=                | ↓ (7-22)     |
| Bilirubina, mg/dL             | =                  | ↑ (4-5)      |

### SOGGETTO NORMALE

Hb 16,2 g/dl  
 G.R. 5.300.000 per ml  
 Ematocrito 48 %  
 Vol. glob. medio 91  $\mu^3$

### PORTATORE SANO DI MICROCITEMIA

Hb 12,9 g/dl  
 G.R. 6.200.000 per ml  
 Ematocrito 39,6 %  
 Vol. glob. medio 64  $\mu^3$

Eritrocitosi compensatoria  
 che assicura un livello di  
 emoglobina di poco  
 inferiore alla norma

## $\alpha$ -TALASSEMIE

Assente o ridotta sintesi di catene  $\alpha$  conseguente a delezione genica o, meno frequentemente, a mutazioni

I geni codificanti per l'  $\alpha$ -globina, situati sul cromosoma 16, sono 4: si indica il complesso genico di ciascun cromosoma con la sigla  $\alpha\alpha$  (primo  $\alpha$  è il gene  $\alpha 2$ , il secondo  $\alpha$  è il gene  $\alpha 1$ ). I geni  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  sono identici.

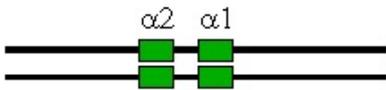
**$\alpha 0$ -TALASSEMIA:** assenza completa di sintesi di  $\alpha$ -globina da parte del complesso genico interessato; entrambi i geni  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  vengono ad essere deleti.

**$\alpha +$ -TALASSEMIA:** riduzione della sintesi, uno dei due geni  $\alpha$  per complesso genico viene risparmiato.

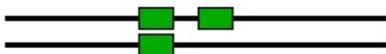
Più frequenti in Asia, in alcune regioni del bacino del Mediterraneo e in Africa.

# GENOTIPI NELLA $\alpha$ -TALASSEMIA

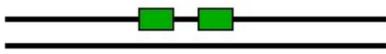
- normally there are four  $\alpha$ -globin genes in heterozygotic somatic cells
- loss of  $\alpha$ -globin genes results in different severities of  $\alpha$ -thalassemia depending on the number of genes lost in combination with deletion chromosomes



normal



$\alpha 2$ -thalassemia (silent carrier state)  $\alpha +$ -thalassemia (eterozigote)

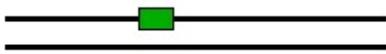


$\alpha 0$ -thalassemia (eterozigote)



$\alpha 1$ -thalassemia (no significant anemia)

$\alpha +$ -thalassemia (omozigote)

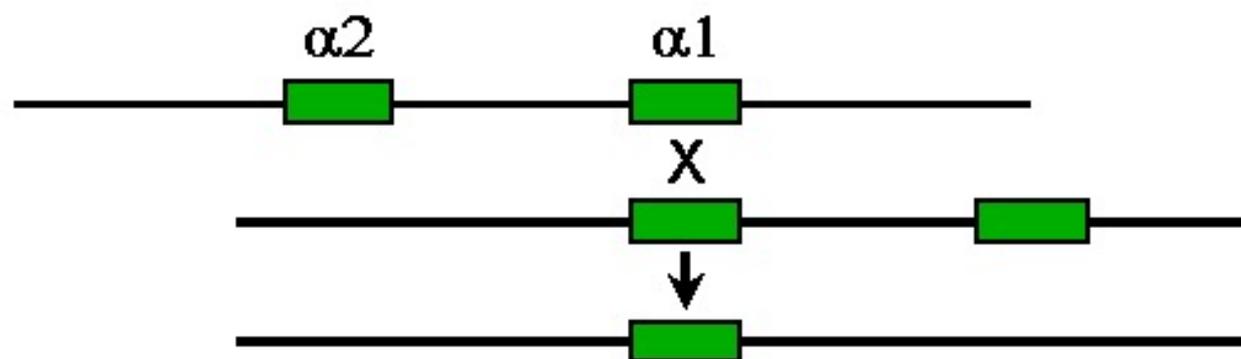


Hb H disease (mild to severe anemia)  $\alpha 0$ - /  $\alpha +$ -thalassemia (eterozigote composto)



hydrops fetalis (fetal or early neonatal death)  $\alpha 0$ -thalassemia (omozigote)

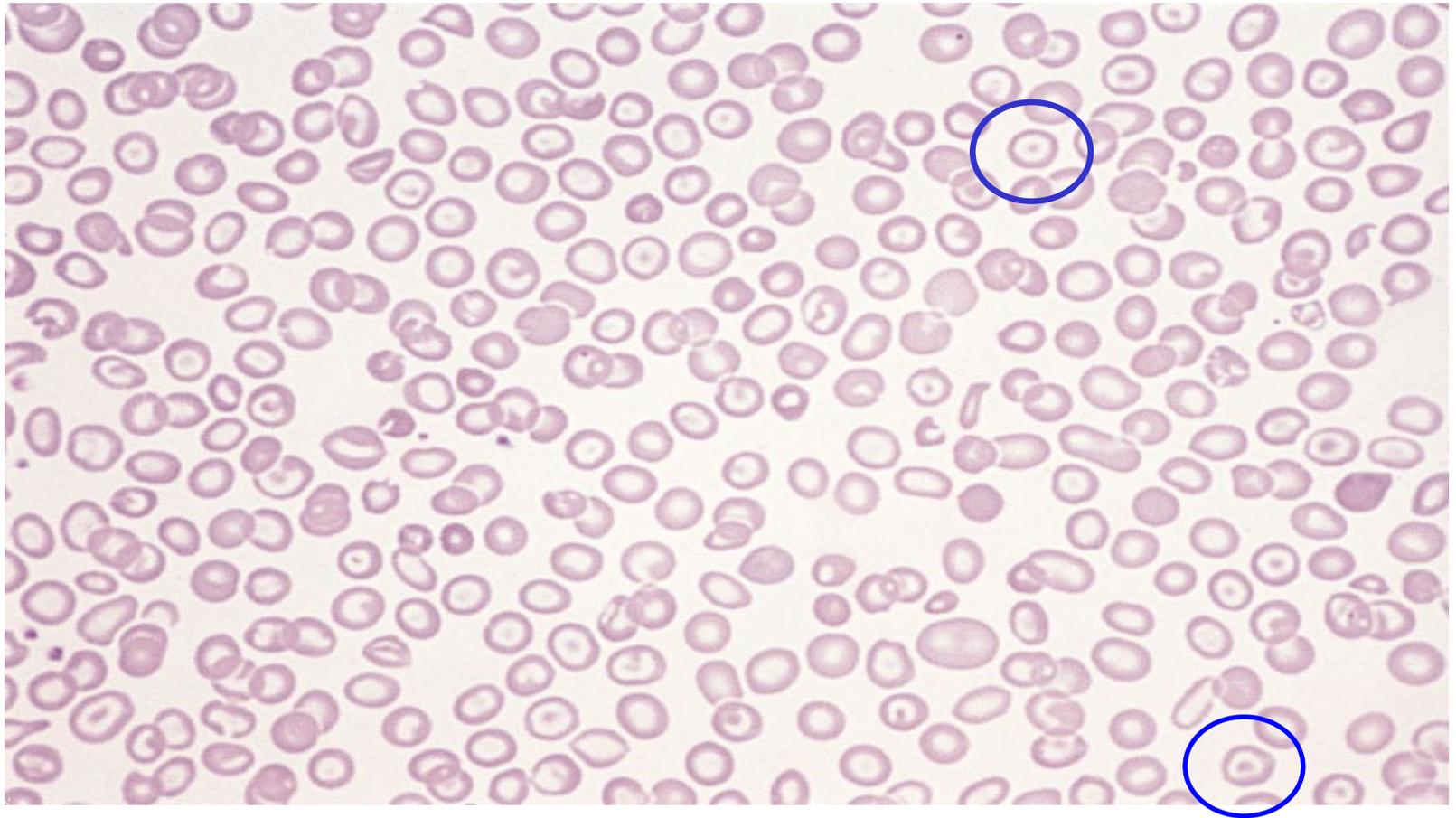
- unequal crossing over
  - $\alpha$ -thalassemia
- the two  $\alpha$ -globin genes arose by gene duplication: they are identical
- unequal crossing over gave rise to the loss of one of the genes
- inheritance of the deleted chromosome gives rise to  $\alpha$ -thalassemia



# FENOTIPI NELLA $\alpha$ -TALASSEMIA

| $\alpha$ -talassemia         |  |  |
|------------------------------|--|--|
| portatore silente            | $-\alpha/\alpha$                             | Asintomatico e senza anomalità strutturali del sangue  |
| tratto $\alpha$ -talassemico | $--/\alpha\alpha$<br>$\alpha\alpha-/\alpha-$ | asintomatico ma con lieve anemia emolitica e con alcune cellule microcitiche                         |
| Malattia H dell'emoglobina   | $--/\alpha-$                                 | Moderata anemia emolitica con ipocromia e microcitosi, forme di HbH da tetrameri di catene $\beta$ . |
| Letale (idrope fetale)       | $--/-$                                       | Mortale <i>in utero</i><br>Tetramero- $\gamma 4$ , (emoglobina di Bart)                              |

Sia la HbH che l'emoglobina di Bart hanno affinità elevatissima per l'ossigeno quindi sono inadatte agli scambi gassosi a livello tissutale



**Talassemia  $\alpha$ : Ipocromia, microcitosi, cellule bersaglio e poichilocitosi**

# $\alpha$ -talassemia: alterazioni ematologiche

|                         | $-\alpha/\alpha\alpha$ | $-\alpha/-\alpha$ | $--/\alpha\alpha$ | $--/-\alpha$ Hb H | $--/--$      |
|-------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|
| Hb, g/dL                | =                      | ↓                 | ↓                 | ↓↓                | ↓↓↓          |
| MCV, fL                 | =                      | ↓                 | ↓                 | ↓↓                | =            |
| Hb A <sub>2</sub>       | =                      | =                 | =                 | ↓                 | assente      |
| Hb F                    | =                      | =/↓               | =                 | ↓                 | assente      |
| Reticol. /1000          | =                      |                   | ↑                 | ↑                 |              |
| Rapporto $\alpha/\beta$ | 0.8                    | 0.6               | 0.6               | 0.3               | 0            |
| Hb Bart nasc. %         | 1-2                    | 5-10              | 5-10              | 10-20             | 80           |
| Altro                   |                        | Hb H rar.         |                   | Hb H (5-30 %)     | Hb Port. 20% |

Hb di Portland,  $\zeta_2\gamma_2$

Hb Bart: emoglobina  $\gamma_4$

Hb Portland:  $\zeta_2\gamma_2$

# FATTORI CONDIZIONANTI L'ENTITA' DELLA TRASFORMAZIONE FALCEMICA

## 1) Quantità di HbS

- Negli eterozigoti ~ 40% dell'Hb è HbS mentre il resto è costituito da HbA che interagisce debolmente con Hbs → se non esposto ad ipossia di grado elevato non presenta nè emolisi nè anemia;
- La presenza di HbF previene la polimerizzazione di HbS → nel neonato la malattia non si manifesta fino al 5-6 mese di vita;

## 2) Concentrazione cellulare di emoglobina

- Omozigoti in cui coesiste la  $\alpha$ -talassemia (ridotta sintesi di catene globiniche che limita la concentrazione emoglobinica totale per cellula) hanno una forma più lieve;
- La disidratazione che provoca un aumento della concentrazione della emoglobina facilita la falcizzazione.

## 3) Diminuzione del pH riduce l'affinità per l'O<sub>2</sub> e quindi aumenta la falcizzazione

# DETERMINAZIONE DELL'ASSETTO EMOGLOBINICO

## ELETTROFORESI

non misura basse concentrazioni di Hb A<sub>2</sub>  
(CV = 33.6%)

## HPLC

molto più accurata (CV = 4.3%)

Sta diventando il metodo di scelta per lo screening delle varianti e per la quantificazione della HbA<sub>2</sub> e della HbF

*CV=coeff di variazione, da una misura dell'accuratezza della misurazione. Più basso è più accurata è la misurazione*

# CML, Leucemia Mieloide Cronica

Nel 95% dei casi di CML



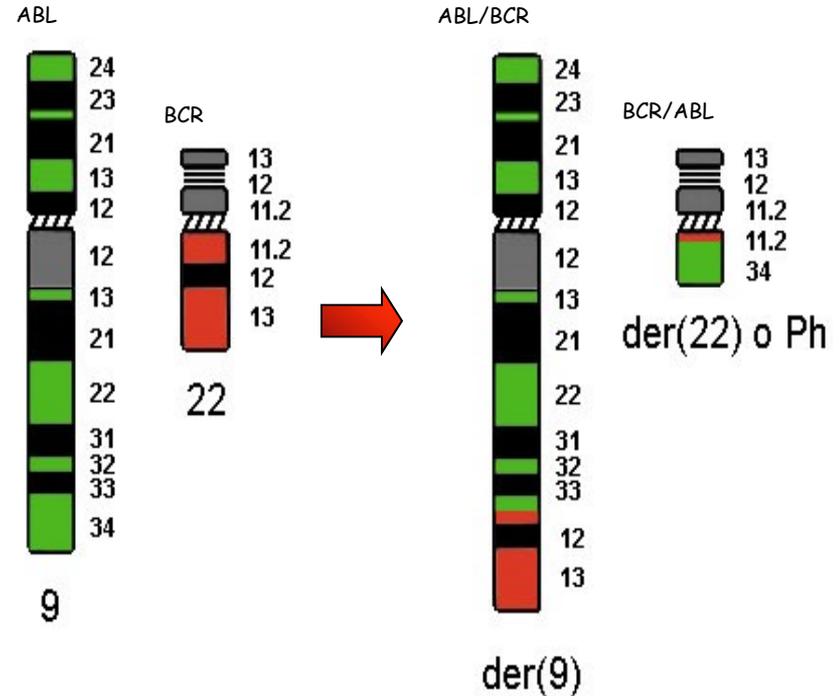
cromosoma non normale  
chr Philadelphia (1961)

Indagini FISH E MOLECOLARI

Traslocazione reciproca braccio lungo  
chr.9 e il braccio lungo chr.22:  
 $t(9;22)(q34;q11)$ .

SI FORMA UN GENE DI FUSIONE:

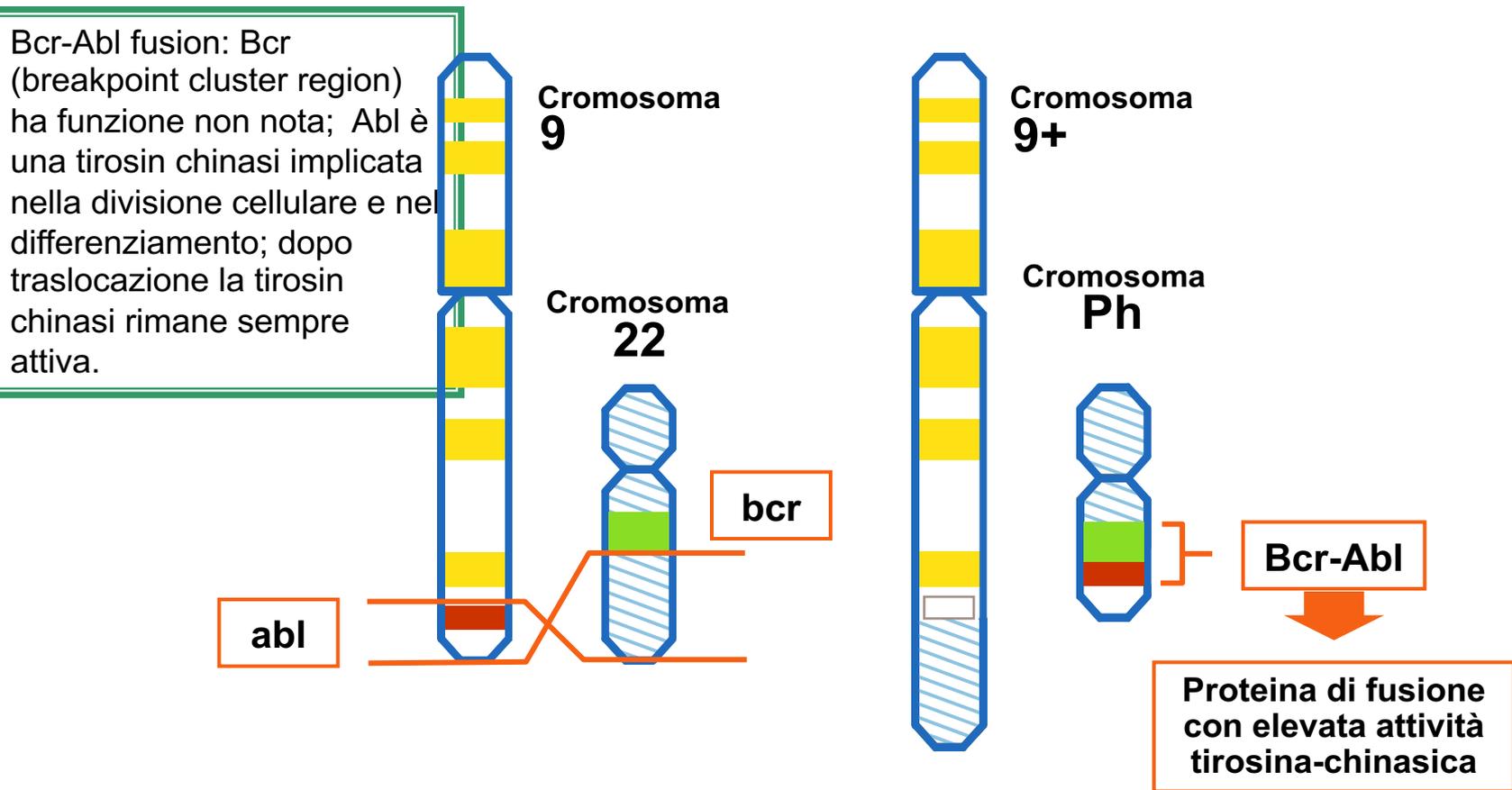
-BCR-ABL su Ph (proteina di fusione coinvolta nella proliferazione cellulare)



# Rappresentazione schematica del cromosoma Philadelphia (Ph)

Leucemia Mieloide Cronica ■■■■

La traslocazione t(9;22)



# Gli ONCOGENI

- Gli **oncogeni** sono geni la cui azione promuove positivamente la proliferazione cellulare.
- Le versioni normalmente non mutate sono propriamente chiamate **proto-oncogeni**.
- Le versioni mutate sono attive in modo eccessivo o improprio.
- **Un singolo allele mutante può influenzare il fenotipo dell'intera cellula, cioè le mutazioni che si verificano sono dominanti.**

## I proto-oncogeni quali funzioni svolgono normalmente?

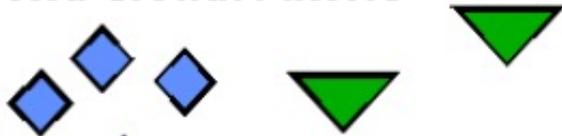
Classe eterogenea di geni che codificano per segnali **STIMOLATORI** del ciclo cellulare, comprendono:

- Fattori di crescita
- Recettori di membrana per fattori di crescita
- Proteine coinvolte nella trasduzione del segnale
- Fattori di trascrizione in grado di legarsi al DNA
- Cicline, chinasi ciclino-dipendenti e loro inibitori (regolatori del ciclo cellulare)

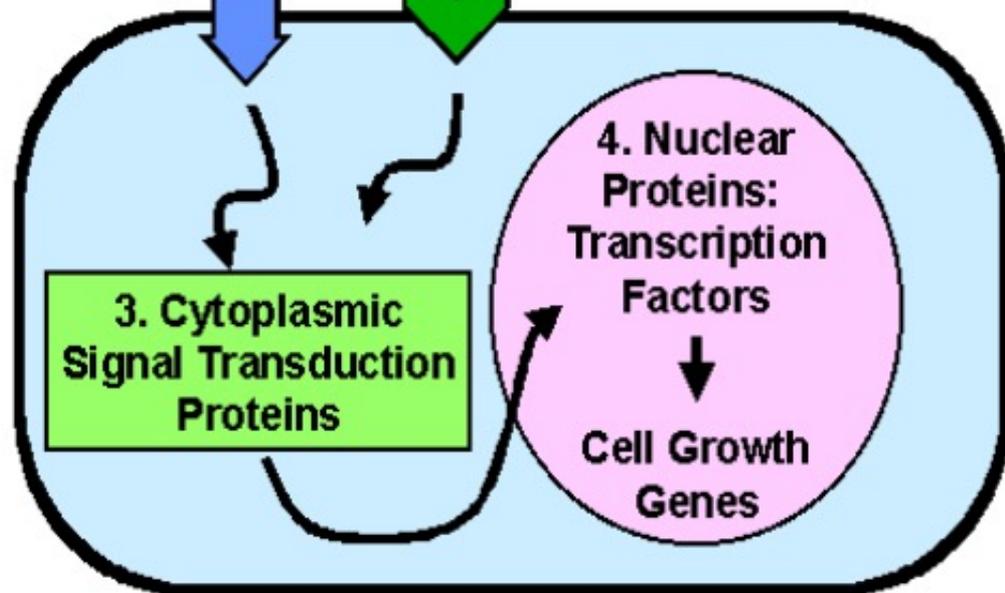
# Oncogeni cellulari (classificazione funzionale)

## Functions of cellular proto-oncogenes

### 1. Secreted Growth Factors



### 2. Growth Factor Receptors



- fattori di crescita (PDGF, FGF, IGF-I, HGF)
- recettori per fattori di crescita (erb B, erb B2)
- proteine di trasduzione del segnale (abl, ras)
- fattori di trascrizione (myc)

# Gli ONCOSOPPRESSORI

- Codificano per prodotti che inibiscono la proliferazione cellulare.
- Le versioni mutanti che si trovano nelle cellule tumorali hanno perso la loro funzione.
- Per cambiare il comportamento di una cellula devono essere inattivati entrambi gli alleli di un gene oncosoppressore, perciò le mutazioni che si verificano a carico di tali geni sono mutazioni recessive.

**ONCOSOPPRESSORI**: frenano la proliferazione – i loro prodotti possono essere: proteine che bloccano i fattori di trascrizione (es. **Rb**), proteine che inibiscono l'attività dei sistemi ciclina+CDK (es. **p16**), proteine (es. **p53**) che inibiscono la progressione del ciclo cellulare in modo indiretto (es. tramite induzione di inibitori delle CDK [**p21/WAF**]).

# Omeostasi di Eritrociti ed Emoglobina

