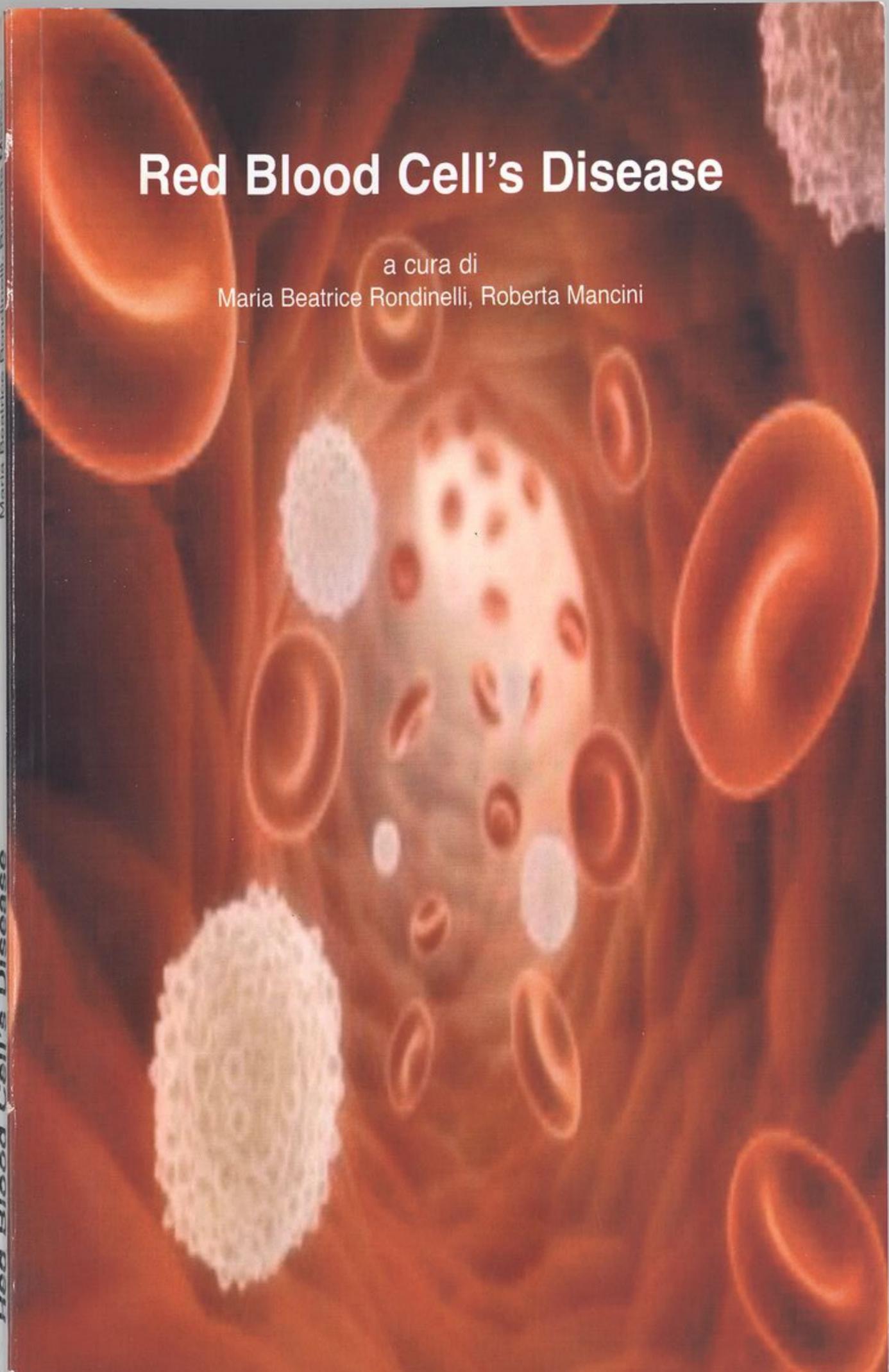


Red Blood Cell's Disease

a cura di
Maria Beatrice Rondinelli, Roberta Mancini

Red Blood Cell's Disease

Maria Beatrice Rondinelli, Roberta Mancini



SFEROCITOSI ED ELLISSOCITOSI EREDITARIE: FISIOPATOLOGIA E PROTOCOLLI DIAGNOSTICI

Patrizia Caprari

Introduzione

Le malattie della membrana eritrocitaria sono un gruppo eterogeneo di difetti congeniti del globulo rosso che si presentano con peculiari anomalie della morfologia eritrocitaria a cui corrisponde un fenotipo clinico ben definito. Le più comuni sono la sferocitosi ereditaria (SE) e l'ellissocitosi ereditaria (EE) con una prevalenza di 1:2000 nel nord Europa, un dato probabilmente sottostimato per la mancanza di diagnosi nelle forme asintomatiche. Sono malattie ereditarie dovute a difetti nei geni che codificano per diverse proteine, sia della membrana che del sottostante citoscheletro, che danno alla membrana eritrocitaria le sue caratteristiche di stabilità e deformabilità. I globuli rossi con difetti delle proteine di membrana presentano una riduzione della vita media cellulare a causa della perdita di parti di membrana e del sequestro splenico che determina l'anemia emolitica, la splenomegalia e l'iperbilirubinemia. La gravità della malattia dipende dall'estensione del danno strutturale della membrana, i pazienti con SE e EE si presentano con un quadro clinico molto eterogeneo, dal portatore asintomatico all'emolisi cronica grave trasfusione-dipendente.

La membrana eritrocitaria

La membrana eritrocitaria è costituita essenzialmente da un doppio strato lipidico, colesterolo e fosfolipidi, ancorato ad una sottostante struttura proteica il citoscheletro. Le proteine della membrana sono molto numerose: più di 50 proteine integrali trans-membrana immerse nel doppio strato lipidico che interagiscono con l'esterno e con l'interno e 10 proteine periferiche del citoscheletro. La proteina integrale più importante è la proteina banda 3 o scambiatore anionico (AE1) che svolge molte funzioni: ancora la membrana al sottostante citoscheletro attraverso le interazioni con l'anchirina e la proteina 4.2; la regione N terminale lega gli enzimi glicolitici e l'emoglobina. La regione C terminale ed il tratto transmembrana forma il canale di tra-

sporto anionico. Tra le proteine integrali troviamo le glicoforine che interagiscono con il sottostante citoscheletro a livello della proteina 4.1 nei siti di giunzione. Il citoscheletro è costituito prevalentemente di spettina nelle sue forme α e β , che si associano a formare un doppio eterodimero, il tetramero, che a sua volta interagisce con altri tetrametri nei siti di giunzione che sono costituiti di filamenti di actina, proteina 4.1, adducina, tropomiosina. I tetrametri sono ulteriormente organizzati in una struttura a rete a maglie che interagendo con la sovrastante membrana la supporta e stabilizza.

Importanti sono pertanto le interazioni verticali ed orizzontali tra queste proteine: le interazioni verticali assicurano l'ancoraggio della membrana al citoscheletro e alterazioni di queste interazioni determinano il rilascio della membrana e danno origine agli sferociti; le interazioni orizzontali che riguardano il legame tra α e β spettina e le interazioni nei siti di giunzione sono importanti perché danno la capacità all'eritrocita di deformarsi, e quindi di passare attraverso i sinusoidi splenici che sono un ambiente metabolicamente avverso.

I progressi nella caratterizzazione della struttura e funzione delle proteine della membrana eritrocitaria e dei rispettivi geni hanno portato una maggiore comprensione della fisiopatologia di queste malattie. Anomalie a carico delle proteine responsabili delle interazioni citoscheletriche verticali spettina, anchirina, proteina banda 3 e proteina 4.2 sono la causa di SE; anomalie delle proteine interessate nelle interazioni citoscheletriche orizzontali (spettina e proteina 4.1) determinano l'EE.

Sferocitosi ereditaria

La sferocitosi ereditaria (SE) è la più comune anemia emolitica congenita presente in tutti i gruppi etnici; è a trasmissione prevalentemente autosomica dominante (75% dei casi), si presenta con anemia di grado variabile, splenomegalia, ittero episodico, raramente si verificano ulcere alle gambe, atassia spinocerebellare, miocardiopatie. Si osserva la presenza nello striscio di sangue periferico di numerosi sferociti aventi una aumentata fragilità osmotica per la riduzione del rapporto superficie/volume. Nel periodo neonatale la SE è comunemente sintomatica, l'ittero è presente quasi sempre e l'anemia può raggiungere livelli tali da richiedere, in molti casi, trasfusioni di sangue.

La classificazione clinica distingue diversi gruppi con severità clini-

ca crescente indicata da un aumento dell'anemia, un aumento della reticolocitosi, corrispondente ad un incremento del numero di sferociti presenti nel periferico e in relazione a questo l'aumento della fragilità osmotica. La gravità della malattia è stato osservato essere in relazione al contenuto di spettrina nelle membrane: eritrociti con un grosso deficit di spettrina danno forme molto gravi di sferocitosi ereditaria trasfusione dipendente.

La diagnosi di SE si basa sulla combinazione di storia familiare e dati clinici personali quali l'anemia, la splenomegalia e l'ittero. Vengono eseguiti i comuni test per le anemie emolitiche: esame emocromocitometrico, striscio di sangue periferico, reticolociti, bilirubina indiretta, aptoglobina, LHD, test di Coombs. Nei pazienti con storia familiare di SE, caratteristiche cliniche ed esami di laboratorio tipici, vale a dire sferociti nello striscio, MCHC aumentato e reticolocitosi si effettua facilmente diagnosi di SE. La presenza di sferociti nello striscio di sangue periferico con negatività del test di Coombs va confermata dai test di fragilità osmotica (Test di fragilità osmotica, test di lisi al glicerolo acidificato o AGLT50, test di legame EMA, test crioemolisi). Come test di conferma viene effettuata l'analisi delle proteine della membrana eritrocitaria, mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE), che permette di individuare le proteine anomale in circa l'80% dei casi. Questa tecnica è utile non solo per identificare il difetto della membrana ma anche l'entità di tale difetto. L'uso delle SDS-PAGE è raccomandato in particolari casi complessi ove non c'è corrispondenza tra il fenotipo clinico e i dati di laboratorio, quando la diagnosi non è chiara in previsione di una splenectomia, quando la storia familiare non presenta casi di SE.

Si osservano diversi tipi di difetti che causano SE: anchirina, spettrina e anchirina, spettrina, proteina banda 3 e proteina 4.2. Il grado di emolisi risulta correlato al contenuto di spettrina degli eritrociti e la varietà di fenotipi biochimici riflette una ampia eterogeneità delle alterazioni molecolari che lo determinano. Differenze cliniche all'interno dello stesso gruppo familiare possono essere spiegate dalla coesistenza di altri tipi di difetto ereditario del globulo rosso, alcuni dei quali con frequenze elevate in Italia (b-talassemia, deficit di G6PD).

Per quanto riguarda la terapia per la SE non esistono terapie risolutive e la maggior parte dei casi di SE da lieve e moderata sono sottoposti ad un follow up annuale con test di laboratorio che monitorizzano l'anemia. Nei casi con SE da moderata a grave è raccomandata la terapia con folati. La splenectomia è la sola terapia curativa nel ridur-

re l'emolisi in quanto prolunga l'emivita eritrocitaria. Presenta tuttavia la possibilità di importanti complicanze e pertanto va effettuata solo in casi di SE grave, che richiedono trasfusioni o sviluppano una importante splenomegalia.

Ellissocitosi ereditaria

L'ellissocitosi ereditaria è presente in tutto il mondo ma è più frequente nelle aree con endemia malarica, particolarmente in individui di origini africana o mediterranea, presumibilmente per la resistenza che gli ellissociti oppongono alla malaria. La vera incidenza della HE non è nota, è stata stimata una prevalenza di circa 3-5:10.000, probabilmente sottostimata potendo le forme più lievi essere asintomatiche.

La malattia si dimostra clinicamente eterogenea e va dal portatore asintomatico con ellissociti biconcavi alla malattia emolitica grave trasfusione dipendente associata con la presenza di poichilociti, cellule arrotondate e frammentate, può essere presente splenomegalia e colelitiasi. Diversi membri della stessa famiglia possono mostrare un diverso grado di espressione della malattia. I neonati portatori di EE hanno spesso ittero neonatale e anemia emolitica grave che può richiedere trasfusioni e si osserva nel sangue periferico un elevato numero di picnociti e poichilociti.

Si distinguono diverse categorie cliniche di EE: EE comune, EE omozigote, piropoichilocitosi (PPE) ereditaria, EE sferocitica e ovalocitosi sud-est asiatica. L'EE comune è la forma prevalente, soprattutto nelle popolazioni africane ed è dovuta prevalentemente a mutazioni della a spettrina e della proteina 4.1. L'EE sferocitica è fenotipicamente un ibrido di una EE comune e di SE. Lo striscio mostra ellissociti, sferociti, microsferociti e microellissociti che risultano osmoticamente fragili. Il difetto molecolare che la determina è la presenza di una b spettrina troncata nell'estremità COOH. L'EE omozigote e la piropoichilocitosi ereditaria sono le forme cliniche più gravi che presentano anemia marcata, splenomegalia e poichilocitosi. Il difetto molecolare è a carico della spettrina, spesso come doppia eterozigoti o come associazione di EE e PPE.

L'ovalocitosi sud-est asiatica è una forma unica di EE ampiamente diffusa in Malesia, Indonesia, Nuova Guinea e Filippine che mostra nello striscio di sangue periferico il 20-50% di ellissociti arrotondati o ovalociti. Il difetto molecolare in questa forma è una delezione nel gene della proteina banda 3.

Le indagini di laboratorio per la diagnosi di EE prevedono oltre alle indagini per le anemie emolitiche (esame emocromocitometrico, striscio di sangue periferico, reticolociti, bilirubina indiretta, aptoglobina, LHD) la caratterizzazione del difetto delle proteine della membrana mediante SDS-PAGE e la valutazione dell'equilibrio di associazione della spettina, mediante la determinazione del rapporto dimero/tetramero di spettina in elettroforesi non denaturante.

I difetto molecolare può interessare sia l'a che la b spettina e provocare una diminuzione del contenuto di spettina nella membrana e/o alterazioni qualitative e funzionali che destabilizzano le interazioni orizzontali delle proteine del citoscheletro. Come ulteriore indagine si può effettuare, presso laboratori specializzati, l'analisi della mappa dei peptidi triptici della spettina che consente di individuare il sito del difetto nell'a o b spettina dalla tipologia peptidi osservati nell' SDS-PAGE.

L' SDS-PAGE permette di caratterizzare i difetti della proteina 4.1R che generalmente si presenta quantitativamente diminuita o con bande aggiuntive a diverso peso molecolare.

Anche nella EE si osservano differenze cliniche all'interno dello stesso gruppo familiare per la coesistenza di altri tipi di difetto ereditario del globulo rosso, in particolare la b-talassemia, ma sono stati individuati anche casi di EE associati a deficit di G6PD e a deficit di piruvato chinasi eritrocitaria.

Per quanto riguarda la terapia le forme tipiche di EE con segni clinici lievi non richiedono trattamento, nei casi gravi possono essere necessarie trasfusioni ed in alcuni casi ci possono essere le indicazioni per la splenectomia e la colecistectomia.