



Ruggero Ceppellini

L'emoglobina normale lenta A_2 :

suoi rapporti con una nuova frazione emoglobinica lenta, B_2 , e sua importanza per il riconoscimento di varianti talassemiche che compaiono nelle famiglie di portatori di *Thalassemia media* e di emoglobinopatia H

Le talassemie, tipicamente rappresentate da quel difetto costituzionale che allo stato omozigote si manifesta con un ben definito quadro clinico, il morbo di Cooley, sono a buon diritto classificate tra le emoglobinopatie ereditarie per quanto siano contraddistinte da una caratteristica negativa fondamentale, e cioè dalla mancata identificazione, almeno sino ad ora, di una variante emoglobinica (tipo S o C) che possa venir riguardata come il prodotto specifico del mutante talassemico. Infatti tale non può essere considerata l'Hb F che è presente fisiologicamente in alcuni stadi dello sviluppo e che inoltre si può ritrovare anche nell'adulto in genotipi estranei al gene talassemico mutante (ad es. falcemia omozigote). Con ciò non si vuole svalutare nè il valore patognomnico di un elevato tasso di Hb F nel morbo di Cooley nè il fatto inoppugnabile (ed importante per l'interpretazione patogenetica del difetto talassemico) che in nessun'altra condizione si raggiungono livelli di F altrettanto elevati quanto nella talassemia omozigote.

In assenza di un prodotto chimicamente identificabile come specifico per il gene talassemico, la diagnosi di talassemia allo stato eterozigote è nondimeno possibile senza ambiguità nella massima parte dei casi, ma deve basarsi su un insieme di dati ematologici di ordine morfologico e quantitativo (cioè statistico), che singolarmente presi non possono essere considerati patognomnici: in particolare il ridotto volume dell'eritrocita, l'aumentata resistenza all'emolisi da soluzioni ipotoniche e le anomalie morfologiche della serie rossa.

Recentemente a questi rilievi ematologici si è aggiunto un dato biochimico che si è rivelato molto utile per la diagnosi della condizione talassemica eterozigote non complicata: l'aumento percentuale della quota emoglobinica lenta, ora nota come Hb A₂, con velocità di migrazione simile a quella dell'Hb E. Devesi subito notare che anche l'Hb A₂, come l'Hb F non può essere riguardata come il prodotto specifico della mutazione talassemica; essa infatti è sempre presente anche nel soggetto normale e la peculiarità del talassemico è soltanto quantitativa poichè in questa condizione la quota A₂ si presenta in genere raddoppiata rispetto ai valori che si riscontrano nel soggetto normale (e per quanto è noto in ogni altra condizione morbosa non talassemica con la possibile eccezione dell'anemia perniciosa in fase di ricaduta, 10).

Tab. I
Valori percentuali di Hb A₂ in soggetti non talassemici e in portatori di *Th. minima*

Autori	Non-talassemici		<i>Thalass. minima</i>		Soglia	Errore
	N° esami-nato	A ₂ % media	N° esami-nato	A ₂ % media		
Ceppellini (4)	140	2.38	102	4.60	—	—
Kunkel <i>et al.</i> (13)	65	2.54	34	5.11	3.09	6.0%
Carcassi <i>et al.</i> (3)	138	2.28	67	5.14	3.37	0.7%
Marinoni <i>et al.</i> (15)	55	2.21	141	4.16	—	—
Silvestroni <i>et al.</i> (23)	54	2.18	74	4.31	—	—
Silvestroni <i>et al.</i> (22)	223	1.95	182	4.22	2.77	0.3%
Gerald <i>et al.</i> (8)	20	2.40	23	4.72	—	—

I vari AA., pur apportando alcune modificazioni di dettaglio, hanno seguito la tecnica originale di Kunkel e Wallenius (14): elettroforesi su piastra d'amido a pH alcalino, eluzione delle macchie e misurazione fotometrica dell'Hb eluita. A₂ è espressa in percento rispetto all'Hb totale. Soglia discriminante tra talassemici e non talassemici ed errore di classificazione, calcolate secondo le formule di L. L. Cavalli-Sforza (cfr. 3 e 13).

Dopo il primo rilievo di Kunkel e Wallenius (14) e la prima casistica probativa riportata da Ceppellini (4), questo dato è stato confermato da numerosi autori (Tab. I) ed è veramente convincente l'identità dei risultati nelle varie ricerche, malgrado le modificazioni di tecnica e il diverso materiale etnico esaminato. Mentre si rimanda all'esauriente lavoro di Kunkel, Ceppellini, Mueller-Eberhard e Wolf (13) per altri aspetti del problema, si vuol sottolineare che anche l'Hb A₂ costituisce un criterio di diagnosi soltanto statistico. Anche per essa come per gli altri dati ematologici, i valori osservati per i normali e per i talassemici si distribuiscono secondo due curve gaussiane, con due medie ben distinte ma che in parte si sovrappongono ed è perciò possibile che singoli individui presentino valori compatibili con quelli della classe opposta; cionondimeno è lecito scegliere una soglia al di sopra o al di sotto della quale è consentita una classificazione con un errore che dipende dalle caratteristiche matematiche delle due curve gaussiane e che in pratica è tanto più piccolo quanto minore è l'area di sovrapposizione tra le due curve. L'accurata analisi statistica cui

abbiamo sottoposto i nostri dati (3) ha dimostrato che l'errore di classificazione in base alla sola Hb A₂ è notevolmente inferiore all'errore in cui si incorrerebbe basando la discriminazione tra talassemici e non talassemici su un qualsiasi altro dato ematologico preso di per sè, ed è di poco superiore all'errore (assai piccolo) che si ottiene considerando tutti gli altri dati insieme come funzione discriminante complessa (Saniscalco e Smith, 25). Eventualmente l'unico rilievo altrettanto sicuro, ma solo in mano a ricercatori di grande esperienza, è l'aspetto morfologico dello striscio che purtroppo non è facilmente obiettivabile nè suscettibile di analisi statistica. Naturalmente, salvo casi particolari, la determinazione quantitativa dell'A₂ non sostituisce ma completa e conferma l'esame ematologico usuale.

È evidente infatti che nella grande maggioranza dei casi i due criteri di giudizio elettroforetico ed emocitometrico-morfologico, coincidono e che il quadro *tipico* e più comune della condizione talassemica eterozigote è costituito da microcitosi vera con aumento delle resistenze globulari, poichilocitosi e valori di Hb A₂ al di sopra del 3%; nella presente trattazione questo fenotipo, ed il gene mutante che ne è responsabile, sono indicati come *microcitemia tipica*, termine equivalente agli altri più noti di *microcitemia costituzionale* e di *Thalassemia minima*, con le limitazioni che si discuteranno a proposito delle varianti.

Particolarmente significativa è la concordanza dell'esame ematologico con l'aumento di A₂ nei genitori di ammalati di morbo di Cooley (*Th. maxima*), per i quali lo stato talassemico eterozigote è confermato anche dal dato genetico. Nessuna eccezione infatti è segnalata da Silvestroni e coll. (24) su 11 genitori esaminati e da Gerald e Diamond (8) su 23 genitori. Nella casistica personale (in parte già pubblicata, 4, 13) su 52 genitori di Cooley 49 mostravano concordanza tra i due criteri di diagnosi ed in soli tre casi uno dei due elementi mancava (vedi più avanti); in nessun caso entrambi gli elementi risultarono negativi. Poichè nelle nostre casistiche i criteri di differenziazione tra *Th. maxima* e sindromi affini (*Th. media*) non furono particolarmente rigidi (essendo la nostra attenzione soprattutto rivolta al riconoscimento dello stato eterozigote non complicato) non è da escludere che nelle tre eccezioni i casi indice corrispondessero ad anemia microcitica grave anzichè a Cooley tipico. Si può comunque concludere che il morbo di Cooley corrisponde nella grandissima maggioranza dei casi allo stato omozigote per due geni microcitemici *tipici* che inducono cioè allo stato eterozigote sia le ben note alterazioni microcitemiche sia un aumento marcato dell'Hb A₂.

Sono stati però individuati alcuni soggetti che presentano invece *i*) reperto ematologico normale con A₂ nettamente aumentata; oppure *ii*) reperto microcitemico indubbio con A₂ nei limiti della norma. Per comodità di esposizione si indicheranno come *MA* (microcitemia evidente - A₂ aumentata) i casi di microcitemia tipica; come *mA* le eccezioni del primo tipo; come *Ma* le eccezioni del secondo tipo; infine come *ma* la condizione non-tallemica caratterizzata dalla negatività di entrambi gli elementi. È opportuno notare che non si riguardano come eccezioni valori di A₂ poco discosti dalla soglia discriminante o parziali discrepanze tra singoli elementi dell'esame ematologico, ad esempio un volume globulare non apprezzabilmente diminuito in presenza di marcata poichilocitosi.

Per contro si considerano vere eccezioni soltanto i casi in cui l'insieme dei dati emocitometrico-morfologici da un lato ed il livello di A_2 dall'altro, presentano una contraddizione così netta (e ripetutamente controllata) da giustificare il quesito se essi non rappresentino entità morbose ed eventualmente genetiche a sè stanti, differenziabili, ed in qual grado, dalla microcitemia tipica. È evidente che ciò può essere giustificato solo se le condizioni atipiche *i*) sono costanti nell'individuo e non indotte da transitorie cause ambientali, *ii*) sono geneticamente determinate come carattere monomero e si ritrovano con la stessa espressività in tutti i consanguinei del probando che portano lo stesso gene mutante in analogo genoma, *iii*) interagiscono con un tipico gene mutante microcitemico (sia esso allelico o di altro *locus*) e con i geni delle altre emoglobinopatie in maniera costante e caratteristica.

Prima di esaminare in dettaglio le due varianti atipiche *mA* e *Ma* è opportuno chiedersi quale sia la causa della chiara correlazione tra manifestazioni microcitemiche ed aumento di A_2 che si riscontra nella grande maggioranza dei soggetti portatori di *Th. minima*.

A questo quesito è impossibile rispondere adeguatamente sino a che non sarà meglio conosciuta l'azione *primaria* del gene talassemico, in altre parole il singolo processo biochimico iniziale dalla cui alterazione discende il quadro morboso finale (il fenotipo del genetista), per quanto complesso e polimorfo esso sia. Infatti la teoria e l'esperienza insegnano che un carattere monomero (ereditato cioè attraverso una singola unità genetica di trasmissione) è riconducibile ad un unico processo metabolico, mentre esempi di veri effetti pleiotropici primari non sono sino ad ora sufficientemente documentati; è bensì vero che alcuni geni *complessi* da considerarsi come singole unità di trasmissione, sono scomponibili in più di una unità di azione (1), in altre parole posizioni contigue del cromosoma (non separabili dal *crossing-over* con frequenza apprezzabile) possono presiedere ad azioni biochimiche distinte, per quanto tra loro correlate al livello fisiologico (ad esempio la sequenza delle reazioni biochimiche che presiedono alla sintesi del triptofano nella *Salmonella*, 7, e presumibilmente, in genetica umana, il locus Rh, 6).

Sembra comunque probabile che l'anemia del morbo di Cooley non possa essere spiegata soltanto dalla diminuita sopravvivenza delle emazie ma derivi anche da una ridottissima capacità dell'emoglobinogenesi di compenso (26), e che pertanto l'errore fondamentale corrisponda ad un grave rallentamento della velocità di sintesi dell'Hb normale. Quanto alle alterazioni dell'eritrocita, poichè al livello molecolare vi deve essere una identità tra struttura e funzione, esse potrebbero essere sia primitive che secondarie al difetto dell'emoglobinogenesi; è pertinente ricordare a questo proposito la brillante osservazione del Bussi (2) secondo la quale la microcitosi si fa apprezzabile durante lo sviluppo dell'eritrono soltanto quando comincia la sintesi del pigmento.

Se si accetta la rallentata velocità di sintesi dell'emoglobina A come difetto fondamentale della microcitemia (di grado diverso nelle due condizioni eterozigote ed omozigote), l'aumento della normale quota lenta A_2 , che sembra essere il prodotto di un sistema genetico-metabolico indipendente da A (vedi più avanti), potrebbe

essere soltanto relativo al rallentamento nella produzione di A. Alternativamente si può pensare che il blocco causato dal difetto microcitemico determini l'accumulo di metaboliti intermediari che stimolano in maniera elettiva il meccanismo di sintesi A_2 .

Per inciso, lo stesso concetto di blocco con accumulo di metaboliti sembra al momento attuale il più congruo per spiegare l'elevata quota di Hb alcaliresistente nel morbo di Cooley: questo accumulo modificherebbe l'ambiente interno dell'eritrocyte simulando in certa maniera le condizioni prevalenti durante alcuni periodi della vita fetale. Si sposterebbero così gli equilibri interni verso il *pattern* metabolico responsabile dell'emoglobinogenesi F, che era stato messo a riposo verso la fine della gestazione per le mutate condizioni; sono d'altronde noti numerosi esempi di sistemi metabolici attivi solo transitoriamente durante lo sviluppo dell'individuo.

È comunque opportuno notare, come già facemmo (3, 4), che il raddoppiamento dei valori di A_2 nel portatore di *Th. minima* tipica rispetto al soggetto normale, è dello stesso ordine relativo di quello osservato nel doppio eterozigote, S-o C-talassemico rispetto al semplice eterozigote S o C. Sarebbe perciò una proprietà caratteristica del gene talassemico quella di deprimere specificamente la sintesi di A, rispettando la sintesi di ogni altra emoglobina normale (A_2) o abnorme (S, C).

Quanto al morbo di Cooley, l'Hb A_2 misurata rispetto all'Hb totale, presenta valori molto variabili, spesso inferiori a quelli del normale; questa depressione può considerarsi però soltanto apparente perchè sembra giustificato sottrarre dal computo la quota alcali resistente, F, se essa è da interpretarsi come il prodotto di una sequenza metabolica diversa da quella che conduce alle Hb del tipo adulto. Quando la percentuale di A_2 venga computata rispetto a Hb totale - F, il rapporto anche nell'omozigote talassemico risulta molto elevato ed in genere superiore a quello che si osserva nello stesso eterozigote.

Reperto ematologico normale con A_2 elevata

L'esistenza di soggetti (*mA*) che presentano un aumento marcato di A_2 in assenza di ogni altro segno ematologico che possa deporre per la microcitemia, è stata indipendentemente segnalata da Carcassi e coll. (3) e da Silvestroni e coll. (22); abbastanza buono è anche l'accordo tra le due casistiche riguardo all'incidenza di questo quadro rispetto alla maggioranza dei portatori di microcitemia tipica (*MA*): 2 su 97 nella serie sarda di Carcassi e coll. (3), 1 su 182 nella serie ferrarese di Silvestroni e coll. (22).

Che questa condizione abbia una base genetica è provato da quanto riferiscono Silvestroni e Bianco (20): in due fratrie il fenotipo *mA* si ripresenta con analoghe caratteristiche in più soggetti, esattamente in 7 su 15; i dati suggeriscono anche (ma non sono prova certa) che si tratti di carattere monomero, non dovuto all'interazione tra più fattori. Questa interpretazione è rafforzata da un altro importante elemento messo in evidenza dagli stessi AA: mentre il fenotipo *mA* è assai raro nella popolazione generale e raro anche rispetto alla microcitemia tipica, esso compare con inattesa frequenza (in tre famiglie su sei!) nel genitore non microcitemico di

probandi affetti da anemia microcitica costituzionale (Silvestroni e coll., 24). Sembra pertanto che una buona parte dei soggetti affetti da sindromi talassemiche di tipo intermedio (ma non tutti!) derivi da matrimoni $MA \times mA$; in base all'esame di 5 casi personalmente studiati Silvestroni e Bianco (20) giungono anzi ad affermare che da tale tipo di incrocio possono nascere figli gravemente anemici, ma sempre distinguibili dal morbo di Cooley per l'assenza di due elementi fondamentali e caratteristici di questa affezione: la *facies* mongoloide e le alterazioni delle ossa craniche con il tipico aspetto a spazzola.

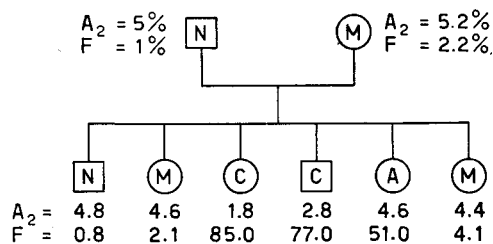


Fig. 1. Famiglia 02/56 — Comparsa di *Th. media* e/o *maxima* da un incrocio tra un genitore portatore di stigmata talassemica tipica ed un genitore non microcitemico ma con A_2 elevata. N = reperto ematologico (volume globulare, resistenze osmotiche, morfologia) normale. M = reperto ematologico tipicamente microcitemico. C = morbo di Cooley o anemia microcitica grave. A = anemia microcitica ben compensata.

Se sarà confermata la validità generale di questa affermazione si dovrà ammettere l'esistenza di una nuova entità genetica (un diverso allele del *locus Th* o anche un allele di altro *locus*) capace di produrre un fenotipo caratteristico sia allo stato eterozigote (mA anziché MA) sia in unione con un tipico mutante talassemico (anemia microcitica anziché tipico morbo di Cooley).

Dato l'interesse genetico e clinico del problema, si ritiene opportuno descrivere in dettaglio un caso di osservazione personale.

Uno dei due casi mA da noi precedentemente descritti è stato riesaminato a distanza di un anno ed anche nel nuovo esame è stata confermato un valore di A_2 elevato (4.6% nel primo esame, 5.1% nel successivo esame) disgiunto da qualsiasi segno ematologico che consenta di porre una diagnosi anche dubitativa di microcitemia. Il reperto sembra pertanto costante e non accidentale. L'individuo, coniugato con una donna portatrice di stigmata talassemica tipica (MA), ha 6 figli viventi (fig. 1) di cui due erano stati riferiti con la diagnosi clinica di Cooley (necessitano di continue trasfusioni; i nostri esami ematologici concordano con tale diagnosi) due sono risultati dei tipici MA come la madre, uno è risultato normale all'esame ematologico ma con A_2 elevata (pertanto mA come il padre), uno infine per quanto riferitoci come clinicamente sano e probabilmente affetto da *Th. minima* (modica splenomegalia, assenza di ittero, non necessita di trasfusioni) ha presentato ai nostri esami un quadro di marcatissima ellittocitosi con 50% di Hb alcaliresistente e 4.6% Hb A_2 ; un quadro pertanto che può essere meglio classificato come *Th. media*.

In questa famiglia è da notare, oltre alla comparsa del raro fenotipo mA nel padre ed in uno dei figli, l'esistenza di almeno un figlio che certamente non può essere classificato nè come semplice microcitemico nè come morbo di Cooley. Viene così ad essere confermato il rilievo di Silvestroni e coll. (24) secondo il quale molti

casi di anemia microcitica costituzionale derivano da matrimoni $mA \times MA$. Sembra invece in contrasto con quanto affermano i detti AA. la presenza di due altri figli diagnosticati come affetti da morbo di Cooley in base alla gravità del decorso clinico, agli esami ematologici ed al quadro emoglobinico; purtuttavia la mancanza di alcuni dati fisici e radiologici non consente di escludere che i due soggetti siano da classificare come quadri Cooley-simili anzichè tipici morbi di Cooley, quando si accettino i criteri di diagnosi differenziale proposti da Silvestroni e Bianco (20). Nondimeno il diverso grado di compromissione dell'emoglobinogenesi nei tre fratelli rende fondato il dubbio che essi non corrispondano ad un identico genotipo; in via di ipotesi si può pensare che il quadro mA nel padre ed in uno dei figli sia dovuto all'interazione di un tipico gene microcitemico con un modificatore che ne limita l'espressione all'aumento di A_2 , normalizzando il quadro morfologico; i due figli gravemente ammalati corrisponderebbero all'omozigote per il gene microcitemico tipico ereditato dai due genitori; il figlio affetto da *Th. media* sarebbe anch'egli omozigote per tale gene, ma avrebbe inoltre ereditato dal padre il modificatore capace di attenuare anche in questo caso la manifestazione del genotipo talassemico.

In conclusione sembrano confermati sia la familiarità del fenotipo mA , che potrebbe essere indicato come *talassemia normocitica*, sia la sua peculiare correlazione con alcuni quadri di *Th. media*, dato questo di grande rilievo e da considerarsi tra i più attuali problemi che le nuove indagini biochimiche hanno aperto nel capitolo delle emopatie mediterranee. Rimane invece qualche dubbio circa l'origine unilocale del fenotipo mA e conseguentemente circa l'interpretazione genetica dei casi di *Th. media* che da esso discendono.

Microcitemia con Hb A_2 non elevata

Già Kunkel e coll. (13) e Carcassi e coll. (3) avevano segnalato l'esistenza di alcuni casi in cui il reperto ematologico di tipo chiaramente microcitemico (diminuito volume delle emazie, aumento delle resistenze osmotiche, anisocromia, poichilocitosi) si accompagnava ad un livello di A_2 non aumentato, anzi piuttosto corrispondente ai valori normali più bassi. Carcassi e coll. (3) riferivano inoltre che questo quadro sembrava avere carattere familiare ed essere particolarmente frequente in alcune comunità della Sardegna; in totale questi AA identificarono 5 eccezioni di questo tipo (*Ma*) su un totale di 198 soggetti normali e 97 soggetti con chiare note microcitemiche ed A_2 elevata (*MA*); per contro Silvestroni e coll. (22) esaminando 182 soggetti microcitemici originari del ferrarese, diagnosticati tali in base agli usuali criteri ematologici, non riscontrarono in alcun caso livelli di A_2 al di sotto della soglia discriminante (nel caso particolare 2.77%). In realtà non è facile stabilire con esattezza la frequenza della variante *Ma*, poichè sarebbe necessario escludere quei soggetti in cui un simile quadro ematologico è sostenuto da anemia sideropenica correggibile con terapia marziale; sono note infatti le simiglianze tra microcitemia e anemia ferropriva, nella quale però A_2 non è aumentata (Kunkel e coll. 13).

Tab. II

Segregazione della variante *Ma* (microcitemia atipica con A_2 non elevata) da incroci *Ma* × normale

Nr. prot. famiglia	Figli		
	Tot.	<i>Ma</i>	<i>ma</i>
01/58 ¹	2	1	1
01/58 ²	2	1	1
04/58	7	3	4
07/58	4	3	1
13/58	4	2	2
	19	10	9

ma = reperto emocitometrico morfologico normale - livello A_2 < 2.8%*Ma* = reperto emocitometrico morfologico di tipo microcitemico - livello A_2 < 2.8%

Recentemente sono state riesaminate 5 famiglie precedentemente identificate per la presenza di almeno un membro portatore della variante *Ma*; prima del nuovo esame era stata praticata nella maggioranza dei soggetti un'energica terapia marziale *per os* onde correggere un eventuale stato sideropenico³. In ogni caso l'incrocio era del tipo *Ma* × *ma* (normale); prescindendo da un figlio in cui era presente Hb H (descritto nel paragrafo seguente) nella prole si ritrovarono soltanto i due fenotipi parentali in proporzione di 1:1 (Tab. II). Si può pertanto confidentemente accettare l'ipotesi che la variante *Ma* sia ereditata come carattere monomero ad espressività costante e caratteristica; in particolare l'assenza tra la prole del fenotipo microcitemico con aumento di A_2 (*MA*) consente di escludere che il fenotipo *Ma* sia dovuto all'interazione tra un tipico gene microcitemico ed un modificatore che sopprime l'aumento dell'Hb A_2 ma non interferisca con l'espressione delle anomalie ematologiche microcitemiche.

In questo caso non sussistono pertanto le riserve avanzate per la variante *ma*, e il fenotipo caratterizzato da microcitemia con A_2 non elevata (*Ma*) è da interpretarsi come la condizione eterozigote per un gene distinto dal tipico mutante microcitemico (*MA*). Non si conoscono sino ad ora incroci *Ma* × *Ma* i quali potrebbero dar origine all'omozigote. Si ricorda però che nella casistica di Kunkel e coll. (13) sono

¹ soggetti 1, 2, 8, 9 dell'albero genealogico riportato in fig. 2.² soggetti 3, 4, 10, 11 dell'albero genealogico riportato in fig. 2; il figlio Nr. 12 non è stato considerato nella tabella perchè probando e portatore di Hb H.

Le altre famiglie sono state identificate attraverso un genitore e non richiedono alcuna correzione per l'analisi delle segregazioni.

³ Sfortunatamente le determinazioni del Fe serico non hanno dato risultati tecnicamente attendibili. Per quanto la familiarità della forma e l'inefficacia della terapia marziale consentano di escludere una anemia sideropenica tipicamente esogena, il metabolismo del Fe merita di essere attentamente studiato nella sindrome *Ma*.

citati due incroci $MA \times Ma$ da cui si ebbero due figli affetti da morbo di Cooley (o da sindrome Cooley simile); la variante Ma sembra perciò potersi sostituire ad un tipico genitore microcitemico (MA) nelle genesi di un fenotipo identico o simile all'omozigote talassemico. Il fenotipo Ma , ed il relativo gene mutante, potrebbero essere indicati come *microcitemia atipica*; deve essere però tenuta presente la possibilità che questa condizione risulti a sua volta geneticamente eterogenea.

Microcitemia ed emoglobinopatia H

In una delle famiglie atipiche riesaminate (Fam. 01/58, fig. 2), originaria dalla provincia di Rovigo⁴, la ripetizione degli esami ha permesso di rilevare nel probando una quota di emoglobina da identificarsi come H. I dati ematologici pertinenti sono riportati nella tab. III.

Tab. III

Soggetto ⁵	Anni	Hb ⁶	G. R. ⁷	V. G. ⁸	R. O. ⁹	A ₂ ¹⁰	F ¹¹	H ¹²	Morfol ¹³
1	35	13.6	5.02	88	95	2.8	1.1	ass.	—
2	44	13.6	5.48	73	79	1.9	3.1	ass.	++
3	39	15.0	6.95	66	74	1.8	2.5	ass.	++
4	36	14.4	4.85	86	99	2.6	0.8	ass.	—
5	42	*	*	*	92	2.6	1.1	ass.	—
6	39	*	*	*	92	2.3	0.8	ass.	—
7	26	*	*	*	99	2.7	1.3	ass.	—
8	16	13.3	4.26	92	98	2.5	1.1	ass.	—
9	13	11.2	5.17	62	74	2.1	2.1	ass.	++
10	19	12.1	4.94	73	82	2.0	1.9	ass.	+
11	16	13.0	4.31	91	99	2.5	0.7	ass.	—
12	14	9.8	5.81	56	39	0.8	4.1	12.0	+++

Risultati degli esami negli individui della famiglia 01/58 rappresentata in fig. 2.

Nr. 12, Diagnosi clinica: anemia microcitica costituzionale. Sin dall'infanzia anemico con peggioramenti che hanno richiesto terapia trasfusionale in occasione di infezioni intercorrenti; si lamenta di algie articolari, lieve subittero sclerale, milza appena debordante

⁴ Ringrazio il Prof. A. Zanaboni per avermi riferito il caso e per aver collaborato nella raccolta dei dati.

⁵ Numero riferimento del soggetto nell'albero genealogico di fig. 2.

⁶ Hb gm/100 ml

⁷ Globuli rossi in milioni.

⁸ Volume globulare in micron cubici.

⁹ Resistenza all'emolisi in sol. NaCl 0.4, lettura fotometrica: nel normale l'emolisi supera il 90%.

¹⁰ Hb A₂ determinata in elettroforesi su piastra d'amido (tampone veronal pH 8.6) espressa in % dell'Hb totale.

¹¹ Hb alcaliresistente secondo il metodo di Singer.

¹² Hb anormale veloce espressa in % dell'Hb totale.

¹³ Morfologia della serie rossa: — normale; +, ++, +++ gradi crescenti di aniso-poichilocitosi, elitocitosi, ecc.

dall'arcata costale. Striscio: intensa anisopoichilocitosi, ed anisocromia. Preparazione al brillant-cresylblau: la quasi totalità delle emazie rivela piccole diffuse inclusioni endoglobulari. All'elettroforesi su piastra d'amido (tampone veronal pH 8.6, $I/2$ 0.05) già dopo poche ore è particolarmente pronunciato uno sperone che si protende dalla macchia principale dell'Hb A verso il fronte di migrazione. Dopo 24 ore, questa macchia più veloce è nettamente separata dalla macchia A. In due differenti campioni esaminati a poche

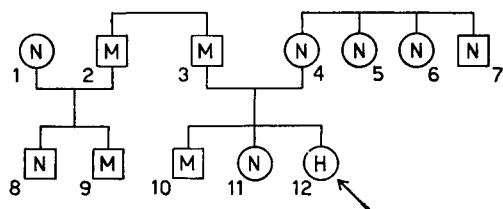


Fig. 2. Anemia microcitica costituzionale con comparsa di emoglobina H in una famiglia (01/58) portatrice di variante talassemica atipica. H = *propositus* portatore di a. m. e. ed Hb H M = portatori di talassemia atipica (microcitemia senza elevazione di A_2) N = normali all'esame ematologico ed al ferogramma emoglobinico. Per i dettagli degli esami vedi Tab. II.

ore dal prelievo la percentuale della frazione veloce era rispettivamente del 9% e del 13%. Mantenendo la soluzione di Hb per parecchi giorni in ghiacciaia si osservava un apprezzabile precipitato con corrispondente riduzione all'elettroforesi della quota veloce. $A_2=0.8\%$, cioè valore abnormemente basso specie in assenza di elevata quota alcaliresistente, reperto che era stato evidenziato anche nell'esame eseguito alcuni mesi prima; era invece sfuggita la presenza della componente veloce forse perchè il campione di sangue era stato conservato per alcuni giorni a temperatura ambiente prima dell'esame elettroforetico.

Nr. 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11: nulla di particolare all'esame ematologico ed al ferogramma. Lo striscio rivela in ogni caso una morfologia eritrocitaria praticamente normale ed i valori di A_2 sono compresi tra 2.3% e 2.8%.

Nr. 2, 3, 9, 10: reperti notevolmente simili nei 4 soggetti. L'esame emocitometrico, le resistenze globulari nettamente aumentate (emolisi in NaCl 0.4 con tampone fosfati), la morfologia dello striscio, sono tipici per *Th. minima*. Brilland-cresyl-blau: una certa aliquota delle emazie presenta qualche inclusioni. In tutti i 4 soggetti A_2 è nei valori inferiori della norma.

L'insieme dei dati fa concludere senza esitazione per un'emoglobinopatia H in accordo con le osservazioni già note (16), in particolare l'assenza di Hb H negli ascendenti del probando. Ma ancor più significativa è la concordanza con il caso descritto da Silvestroni e coll. (24), il primo della letteratura in cui siano riportati anche i valori dell'Hb A_2 : prescindendo dal valore più elevato di Hb H nel soggetto qui descritto (ma sempre in percentuali ben lontane da quelle riferite in soggetti di origine asiatica) non può essere coincidenza fortuita che in entrambi i casi la famiglia di uno dei due genitori non abbia rivelato alcun carattere ematologico abnorme, mentre nella famiglia dell'altro genitore è presente il quadro atipico e relativamente raro di microcitemia dissociata dall'aumento di Hb A_2 .

D'altronde anche Gerald¹⁴ e Diamond (8) riferiscono brevemente lo stesso reperto

¹⁴ P. S. Gerald mi ha cortesemente comunicato che in 5 famiglie di origine mediterranea con emoglobinopatia H (valori nel probando compresi tra 6% e 20%) lo schema genetico è risultato perfettamente conforme a quello rilevato nel caso qui descritto: un genitore normale e l'altro portatore di microcitemia con A_2 non elevata.

nei consanguinei microcitemici di un loro soggetto portatore di emoglobinopatia H e parlano di *non-thalassemic, hereditary, microcytosis* contrapposto a *classical thalassemia trait* per il comune sipo *MA*.

Quanto al ramo materno della famiglia ove tutti i soggetti appaiono normali sotto ogni rispetto, per il momento si può soltanto supporre che esso sia portatore di un fattore totalmente recessivo che concorre alla genesi di un quadro clinico di *Th. media* con comparsa di Hb H, quando si incontra con il gene responsabile, di per sè, del quadro *Ma*.

Microcitemia e Lepore trait (o Hb G)

Per quanto non sostenuta da esperienza personale diretta, è pertinente in questa sede una breve discussione del caso recentemente pubblicato da Gerald e Diamond (9): questi AA. hanno identificato in un soggetto di origine italiana affetto da un quadro clinico classificabile come morbo di Cooley la presenza di una quota emoglobinica (5% rispetto all'Hb totale; 14% sottraendo la quota alcaliresistente) con mobilità elettroforetica simile a quella dell'Hb S. Il padre era un portatore di *Th. minima* tipica (*MA*). La madre invece era classificata come microcitemica in base all'esame emocitometrico morfologico pur presentando valori di Hb A₂ non aumentati (quindi tipo *Ma*); inoltre era rilevabile una quota emoglobinica a mobilità simil-S analoga a quella del figlio (10%-15%). Anche altri 4 consanguinei della madre (il padre, la sorella e due zii paterni) presentavano analogo reperto.

La segregazione di questo carattere nella famiglia suggerisce che esso sia determinato da un unico gene e rende poco probabile l'ipotesi che esso sia dovuto alla interazione o all'associazione casuale di un gene talassemico atipico (*Ma*) con un fattore responsabile della quota emoglobinica abnorme. Gli AA. scartano (per la verità con non motivata precipitazione) la possibilità che tale emoglobina sia da identificarsi con D, G, L (che pure migrano a pH alcalino con velocità simile ad S) e la indicano come Hb *Lepore* (dal cognome della famiglia).

La malattia del probando deriverebbe dall'interazione tra un tipico gene microcitemico (ereditato dal padre) ed un gene *Lepore*, responsabile, da solo, della comparsa sia della microcitemia sia della nuova emoglobina.

La stigmatte *Lepore* dei due AA. americani ricorda moltissimo il quadro descritto da Silvestroni e Bianco (2), in due soggetti, padre e figlio, come *associazione di Hb G e microcitemia*: eguale è il reperto ematologico, l'aspetto dei ferogrammi e la quota della emoglobina abnorme (12% e 14%); unica sostanziale differenza sarebbe l'aumento di A₂ (3.5% e 3.6%). Gli AA. italiani si richiamano al caso di Hb G descritto da Schwartz e coll. (17) e interpretano i loro soggetti come portatori di due mutazioni distinte: un gene per l'Hb G ed un gene talassemico tipico (*MA*); nel caso di Schwartz e coll. l'interazione, postulata di questo tipo, produceva però una quota di Hb G vicino al 100%; è possibile pertanto che anche i soggetti di Silvestroni e Bianco siano da interpretarsi come stigmatte *Lepore*.

Questa possibile divergenza di interpretazione mostra quanto sia difficile caratterizzare ed identificare le nuove emoglobine che si vanno via via descrivendo; ed ancora più difficile è orientarsi tra le varie pubblicazioni spesso basate su criteri clinici e tecniche di laboratorio non esattamente confrontabili. Comunque la stig-

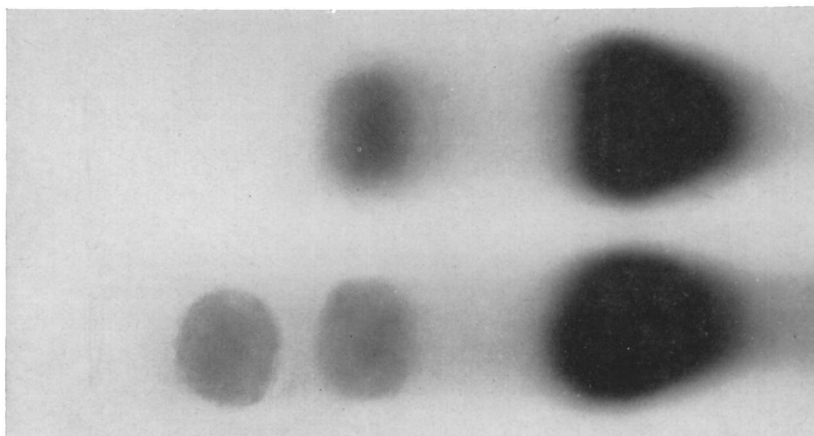


Fig. 3. Elettroforesi su piastra d'amido (pH 8.6 L/2 0.05) - migrazione da sinistra a destra. Sopra, a sinistra, l'emoglobina lenta è raccolta nell'unica macchia A_2 . Sotto l'emoglobina lenta è sdoppiata in due macchie, l'una corrispondente ad A_2 , l'altra a migrazione ancora più lenta corrispondente a B_2 .

mate *Lepore* sembra più vicina alle talassemie che alle emoglobinopatie con pigmento anormale specifico e, in attesa di una sua definitiva classificazione, deve essere tenuta presente nella diagnosi differenziale delle mirocitemie ereditarie.

L'emoglobina B_2

Nel corso di una ricerca sulla frequenza della talassemia nei Negri Americani (Kunkel, Ceppellini, Dunn, Firschein, dati inediti) si osservò in più membri di una stessa famiglia che la macchia usualmente corrispondente alla Hb A_2 era sdoppiata in due macchie più piccole, l'una nella posizione caratteristica di A_2 (che è identica a quella dell'Hb E) e l'altra più vicina al catodo e corrispondente ad una velocità di migrazione ancora più lenta di quella caratteristica per l'Hb C (a pH alcalino). Questa seconda componente emoglobinica più lenta è stata designata B_2 (fig. 3). È opportuno sottolineare che la posizione di B_2 è leggermente più arretrata della frazione proteica non pigmentata e rilevabile su carta dopo colorazione; questa frazione, inappropriatamente designata A_3 da Silvestroni e coll. (24), non è una emoglobina (13) e non ha nulla a che fare né con A_2 né con B_2 .

Ognuna delle due macchie corrispondeva all'1% circa dell'Hb totale e perciò

era pari alla metà dei valori usuali di A_2 , mentre la somma delle due macchie dava valori eguali a quelli che si riscontrano normalmente per l'unica macchia A_2 .

Estendendo le indagini sono stati individuati altri tre gruppi familiari presentanti le stesse caratteristiche per cui stimiamo che il carattere abbia nei Negri Americani una frequenza vicina all'1%.

Nel complesso da 8 matrimoni « normale \times emoglobina lenta sdoppiata » si sono osservati 19 figli del tipo normale e 18 con lo sdoppiamento il quale sembra perciò

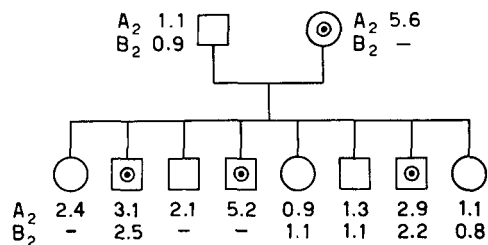


Fig. 4. Famiglia Rob. J. — Coesistenza nella stessa famiglia delle due anomalie microcitemia e sdoppiamento dell'emoglobina lenta nelle due frazioni A_2 - B_2 . Contrassegnati da cerchietto i soggetti che presentano reperto ematologico tipicamente microcitemico. In bianco i soggetti che non presentano microcitemia. A_2 e B_2 (se presente) espressi in % dell'Hb totale. Si noti che le due frazioni sono presenti in quantità pressochè eguali, la cui somma corrisponde ai valori usuali per la sola A_2 , sia nei soggetti normali che nei microcitemici.

essere ereditato come carattere monomero aplosufficiente, con segregazione 1 : 1 in questo tipo di matrimonio. Particolarmente interessante notare che la coesistenza del gene responsabile dello sdoppiamento, ereditato dal padre, con un gene talassemico tipico (*MA*) ereditato dalla madre, ha indotto in due dei figli della famiglia riportata in fig. 4 un raddoppiamento dei valori di entrambe le macchie, la cui somma pertanto (A_2+B_2) dà una percentuale di emoglobine lente caratteristica per la stigmata talassemica. In un'altra famiglia lo sdoppiamento dell'emoglobina lenta si accompagnava al *trait* falcemico, cosicchè nello stesso soggetto si osservavano 4 frazioni emoglobiniche ben distinguibili in base alla migrazione elettroforetica (B_2 , A_2 , S, A).

La presenza dell'Hb B_2 accanto ad A_2 non induce alcuna manifestazione clinica o ematologica, nondimeno costituisce un reperto di grande interesse poichè contribuisce a chiarire la natura della Hb A_2 ed è prova della eterogeneità genetica di quello che è considerato il quadro emoglobinico normale. Infatti in base ai rapporti quantitativi tra A_2 e B_2 sia nei soggetti non-talassemici che nei talassemici, riteniamo di poter concludere che B_2 è il prodotto allelico di A_2 e che pertanto le due emoglobine lente sono determinata da un *locus* diverso dal o dai *loci* responsabili della sintesi dell'Hb A e delle sue varianti abnormi (S, C, ecc.).

Il soggetto normale che presenta la quota lenta raccolta nell'unica macchia in posizione A_2 corrisponde quindi all'omozigote per l'allele più frequente di tale *locus* ed il suo genotipo potrebbe essere indicato come Hb_2^A / Hb_2^A ¹⁵; il soggetto con le due

¹⁵ Il problema della terminologia genetica è estremamente arduo da risolvere con soddisfazione di tutti. Riservando il termine Hb_1 per i geni al locus responsabile delle mutazioni S e C che si sono dimostrate alleliche (perciò 3 alleli noti: Hb_1^S , Hb_1^C , Hb_1^G) il termine Hb_2 , sebbene già usato (27) per designare il locus responsabile della emoglobina G (non allelica con S), appare più appropriato per indicare il locus responsabile delle frazioni lente « due ».

macchie A_2 e B_2 corrisponde all'eterozigote Hb_2^A/Hb_2^B , infine l'omozigote per il mutante Hb_2^B , non ancora osservato, dovrebbe presentare una unica macchia in posizione B_2 con valori pari a quelli che si osservano per l'unica macchia A_2 nel soggetto normale.

Per quanto già fossero noti altri elementi che deponevano in tal senso (11), l'identificazione dell'Hb A_2 ha dimostrato in maniera incontrovertibile che l'Hb del soggetto adulto normale non è omogenea e che deve essere riguardata come un miscuglio di entità chimico-fisiche simili ma pur sempre distinguibili. Tale eterogeneità chimico-fisica deponeva in via indiretta anche per una eterogeneità genetica, ma non ne era prova assoluta, poichè infatti A_2 avrebbe potuto essere considerata come un prodotto collaterale e relativamente indifferenziato dell'unico *pattern* metabolico che conduce alla produzione delle emoglobine adulte; oppure essa avrebbe potuto essere il prodotto di un sistema genetico fisiologicamente meno importante ed indipendente da quello responsabile dell'Hb A. Queste due alternative erano già state prospettate in nostri precedenti lavori (3, 13). Ma un sistema genetico può essere formalmente riconosciuto come tale soltanto quando se ne conoscano almeno due aspetti contrapponibili, indotti da due alleli differenti; nel caso dell'emoglobina normale lenta questo riconoscimento è stato raggiunto con l'identificazione di B_2 come prodotto allelico nei confronti di A_2 .

Discussione

I dati riferiti nei precedenti paragrafi si prestano ad alcune considerazioni di ordine generale concernenti i fenomeni dell'emoglobinogenesi ed i quadri morbosi su base ereditaria ad essi attinenti. Allo scopo, i dati della genetica formale, sempre assai ardui da raccogliere nell'Uomo, devono essere prudentemente integrati con l'interpretazione fenogenetica delle osservazioni cliniche e dei processi fisiopatologici che ne costituiscono il substrato. Due in particolare sono i problemi che possono essere vantaggiosamente discussi sulla base delle osservazioni qui riportate: l'eterogeneità genetica del quadro emoglobinico normale e l'eterogeneità genetica, e quindi clinica e nosologica, delle talassemie.

ETEROGENEITÀ DEL QUADRO EMOGLOBINICO NORMALE

L'identificazione dell'emoglobina normale lenta A_2 ha costituito incontrovertibile prova della eterogeneità chimico-fisica della emoglobina nel soggetto adulto normale; la successiva identificazione di una seconda Hb lenta, B_2 , come prodotto di una mutazione che incide sulla comparsa di A_2 senza interferire con l'espressione delle Hb adulte A ed S, ha dimostrato che il quadro emoglobinico normale è eterogeneo anche dal punto di vista genetico, perchè prodotto da almeno due sistemi genetici, (Hb_1 e Hb_2) diversi e relativamente indipendenti fra loro almeno sul piano funzionale (non si hanno per il momento informazioni circa possibili *linkages*).

Nel caso del sistema A_2-B_2 questa indipendenza risulta di immediata comprensione perchè già l'allele più comune, Hb_A^A , produce una frazione emoglobinica, A_2 , che si distingue dal restante pigmento normale globalmente indicato come HbA ; ma lo stesso concetto può essere esteso ad altre emoglobine abnormi, quali G (Schwartz e coll., 17) ed Hopkins-2 (Smith e Turbert, 18) che sembrano indipendenti dal *locus Hb* (mutazioni S-C) e presumibilmente anche dal *locus Hb₂*, benchè al momento attuale i prodotti dei rispettivi alleli normali non siano identificabili in quanto rappresentano soltanto un'aliquota dell'emoglobina A che è riguardata come omogenea. Questa omogeneità potrebbe essere soltanto apparente per insufficienza delle attuali tecniche analitiche, ma può d'altra parte ammettersi che esistano più sistemi genetici i quali concorrono in maniera relativamente indipendente (in parallelo anzichè in serie) alla produzione dell'Hb A: in altre parole i loro alleli normali produrrebbero tutti un'identica molecola, l'HbA, mentre le mutazioni ai vari *loci* darebbero luogo a frazioni emoglobiniche differenziate (S, o G, o Hopkins-2); esempi di reiterazione di sistemi genetici che controllano processi di importanza vitale, quale indubbiamente è la emoglobina, sono già noti.

Al momento questa è soltanto un'ipotesi, che non basta a spiegare tutti i fatti noti senza l'ausilio di ipotesi sussidiarie: ad es. se S e G non sono prodotti di alleli, come risulta in base alle segregazioni familiari, non si comprende perchè nel doppio eterozigote « S/+; G/+ » descritto da Schwartz e coll. (17) è soppressa o quantomeno grandemente ridotta la sintesi dell'Hb A, pur avendo l'individuo un allele normale a ciascun dei due presunti *loci*; nè tantomeno si spiega l'assenza, almeno apparente, di *Hb* normale nel genotipo « S/S; +/+ ». Non è improbabile che in un prossimo futuro la sintesi dell'emoglobina nell'Uomo risulti controllata da una costellazione di geni, in parte formalmente indipendenti, in parte più o meno strettamente concatenati, ma tutti interagenti tra loro al livello fenotipico secondo complessi fenomeni di dominanza e di epistasi.

ETEROGENEITÀ DELLE TALASSEMIE

Per quanto riguarda le variazioni quantitative dell'Hb A_2 , i dati esposti, personali e della letteratura più recente, obbligano a considerare l'aumento di A_2 come manifestazione del fenotipo microcitemico eterozigote, altrettanto fondamentale e caratteristica quanto le alterazioni strutturali dell'eritrocita che si rilevano all'esame emocitometrico e morfologico (*microcitemia tipica, MA*). Esistono nondimeno casi più rari che presentano una netta dissociazione tra i due elementi e che possono, almeno in teoria, essere determinati da situazioni diverse. In primo luogo, benchè non si conosca l'intima ragione metabolica della correlazione tra alterazioni eritrocitarie e livelli di A_2 , la natura statistica dei due elementi rende possibile ed anzi probabile che talora una variabile espressività del carattere porti casualmente, per una sommazione di cofattori non analizzabili, ad un'ampia dissociazione fra le due manifestazioni del gene microcitemico tipico. Inoltre deve essere tenuta presente l'eventualità che anche

specifici fattori, genetici o ambientali, possano parzialmente sopprimere una delle manifestazioni di detto gene; ad es. J. Neel (comunicazione personale) ha osservato un soggetto con reperto ematologico non-talassemico (assenza di microcitosi vera, diminuita resistenza osmotica) ma con aumento dell'Hb A₂, in cui la dissociazione sembrava dovuta alla interazione tra un gene microcitemico tipico, *MA*, ed il fattore responsabile della sferocitosi ereditaria, che erano però riconoscibili come tali negli altri consanguinei; un'interpretazione di questo genere non è stata esclusa per la variante che compare nella famiglia riportata in fig. I.

Infine i fenotipi meno comuni possono essere interpretati come dovuti a nuove mutazioni, distinte dal gene responsabile della microcitemia tipica, e solo in questo caso essi meritano di essere riguardati come varianti talassemiche autonome. Evidentemente la scelta fra le varie possibilità indicate (che d'altronde non sono mutualmente esclusive) può avvenire soltanto sulla base dei dati genetici. Questi al momento si basano su un numero limitato di famiglie, specie per quanto riguarda la variante *mA*; nondimeno la coesistenza negli stessi ceppi familiari di forme che compaiono molto raramente nella popolazione generale, sembra nel complesso abbastanza probativo per sostenere l'esistenza di almeno tre entità genetiche: *MA*, *Ma*, e con riserva *mA*, in quanto ereditate ognuna come prodotto di un unico gene che non segrega nelle sue distinte manifestazioni fenotipiche della morfologia eritrocitaria e del livello di A₂. Un ulteriore ed importante argomento per mantenere le due varianti separate dalla mutazione microcitemica tipica è rappresentato dal fatto ormai ben provato che esse compaiono con frequenze significativamente superiori all'atteso tra i consanguinei di probandi affetti da sindromi anemiche meno comuni, affini ma pur sempre distinguibili dal morbo di Cooley: da un lato infatti in tutti i casi di emoglobinopatia H sino ad ora studiati, la microcitemia che si rileva in uno dei due genitori e nei suoi consanguinei, è *atipica* in quanto non accompagnata da aumento di A₂ (*Ma*). D'altro lato sembrano confermate le brillanti osservazioni di Silvestroni e Bianco (20) circa l'elevazione dell'Hb A₂ nel genitore non-microcitemico di individui affetti da anemia microcitemica costituzionale. Per inciso è opportuno notare che non tutti gli ammalati di questo tipo discendono da incroci *MA* × *mA*; esistono probabilmente altre condizioni e combinazioni genetiche, per il momento non identificate, capaci di produrre sindromi genericamente classificabili come *Thalassemia media*, la quale pertanto a differenza del morbo di Cooley non corrisponde ad un unico ben definito genotipo.

Ammessa l'individualità delle tre postulate mutazioni si dovrebbe decidere se esse sono alleli di uno stesso *locus* o se invece appartengono a *loci* diversi, concatenati o indipendenti; attualmente il quesito non può avere risposta poichè non è noto alcun dato familiare informativo. Può essere tuttavia giustificato in questa sede avanzare qualche speculazione: mentre è indubbio che a difetti morfologici e funzionali simili od anche identici al livello fenotipico, si può giungere per mutazioni di *loci* diversi, è nondimeno suggestivo pensare a 4 alleli dello stesso *locus Th* (*Th^{MA}*, *Th^{Ma}*, *Th^{mA}*, ed infine *Th^{ma}* per l'allele normale); ma in tal caso, proprio per l'esistenza dei due geni *Ma* ed *mA* in cui le due manifestazioni fenotipiche fondamentali risultano disso-

ciate, mentre esse non possono segregare dall'allele *MA*, si deve tener presente la possibilità di un *locus* complesso, tipo *Rh*, in cui l'unità di trasmissione ereditaria, il gene in senso classico, è scomponibile in almeno due unità fisiologiche e mutazionali, responsabili di due effetti primari che si riflettono su due aspetti correlati del fenotipo: rispettivamente sulla morfologia eritrocitaria e sul livello di A_2 (cfr. Benzer, 1). Una tale ipotesi, anche se vera, sarebbe estremamente difficile da provare date le limitazioni del materiale umano, ma deve essere nondimeno tenuta presente per le implicazioni di ordine patogenetico.

In conclusione, il riconoscimento quantitativo dell'emoglobina A_2 , unitamente all'analisi genetica, ha già contribuito ed ancor più promette di contribuire ad una migliore conoscenza delle emopatie mediterranee, che hanno rivelato una notevole e forse insospettata eterogeneità fenotipica e genotipica. Nondimeno le varianti rare presentano una indubbia affinità fisiologica con la mutazione talassemica più comune, in quanto si manifestano con l'uno o con l'altro dei due elementi (alterazioni eritrocitarie ed aumento di A_2) caratteristicamente associati nella microcitemia tipica; inoltre esse interagiscono con un tipico gene microcitemico dando luogo a sindromi anemiche differenziabili, ma pur sempre affini al morbo di Cooley. Infine esse sono state sino ad ora ritrovate in quegli stessi ceppi etnici in cui compare frequentemente la microcitemia tipica; mentre per il momento questa coincidenza può essere dovuta soltanto a ragioni metodologiche, è probabile che essa abbia un più intimo significato di ordine evolutivistico.

Tutti questi indizi suggeriscono l'esistenza tra queste varie forme di un comune denominatore di ordine metabolico e costituiscono pertanto una valida ragione per mantenere riunite le varianti e la microcitemia tipica in un unico capitolo nosologico, quello delle *talassemie*, termine che potrebbe essere riservato ad indicare, nell'ambito più vasto delle emoglobinopatie, tutti quei difetti ereditari che interferiscono direttamente con l'emoglobinogenesi pur non manifestandosi con la produzione di un pigmento abnorme specifico.

Riassunto

1. In base ai dati personali e della letteratura l'A. ritiene che l'aumento dell'emoglobina normale lenta A_2 (> 3%) costituisca insieme alle manifestazioni ematologiche microcitemiche un elemento fondamentale del fenotipo eterozigote talassemico più comune (*microcitemia tipica*, qui brevemente indicata come *MA*). Ciò viene confermato dal fatto che i rari casi di dissociazione tra i due elementi *i*) reperto ematologico normale con A_2 elevata (*mA*), *ii*) alterazioni microcitemiche con A_2 non elevata (*Ma*), hanno carattere di familiarità e non sembrano dovuti a parziale espressione di un tipico gene talassemico.

2. La natura unilocale della variante talassemica *Ma*, *microcitemia atipica*, risulta chiaramente comprovata dalle segregazioni in 5 matrimoni *Ma* × *ma* (normale) che hanno dato luogo a 10 figli *Ma* e 9 *ma*. Questa stessa variante compare inoltre tra i consanguinei di un probando affetto da emoglobinopatia H, nato da un incrocio

$Ma \times ma$. Poichè altre osservazioni recentissime della letteratura confermano questo dato, il rapporto tra emoglobina H e *microcitemia atipica* (relativamente rara tra le talassemie in senso lato) assume un significato eziologico ben preciso.

3. La natura unilocale della variante talassemica mA (*talassemia normocitica?*) è per il momento più incerta per insufficienza di dati. È descritta una famiglia in cui la variante mA si ripresenta nel padre e in uno dei figli (matrimonio $mA \times MA$) mentre un altro figlio è affetto da anemia microcitica costituzionale. Viene così confermata la peculiare relazione tra questi due fenotipi relativamente rari, secondo quanto hanno già osservato Silvestroni e Bianco.

4. Al momento non esistono dati sufficienti per decidere se i diversi tipi di talassemia sono prodotti da mutazioni di uno stesso o di differenti *loci*. Se comunque sarà provato che esse sono alleliche, dovrà essere tenuta presente la possibilità che il relativo *locus* sia di tipo complesso, con distinte subunità funzionali e mutazionali, responsabili di aspetti del fenotipo, diversi ma fisiologicamente correlati.

5. Si descrive l'emoglobina B_2 , identificata recentemente da Kunkel, Ceppellini, Dunn e Firsheim (dati in corso di pubblicazione) che è da interpretarsi come il prodotto di una mutazione al *locus* Hb_2 responsabile della sintesi di A_2 . La relazione di allelismo tra A_2 e B_2 è prova di eterogeneità genetica del quadro emoglobinico dell'adulto normale e può costituire un modello per interpretare anche l'emoglobina A come geneticamente eterogenea malgrado la sua apparente omogeneità chimica.

6. Si conclude sottolineando l'eterogeneità fenotipica e genotipica delle sindromi genericamente indicate come talassemie. Nondimeno è probabile che esse interessino momenti metabolici correlati. Si propone pertanto che il termine generico di *talassemia* venga adottato per indicare tutti quei difetti ereditari che interferiscono direttamente con l'emoglobinogenesi pur non estrinsecandosi con la produzione di emoglobina anormale specifica.

Bibliografia

1. BENZER, S.: The elementary units of heredity-in The Chemical Basis of Heredity. Ed. J. Hopkins Press, Baltimore, 1957.
2. BUSSI, L.: Sulla genesi della microcitosi nel cosiddetto ittero emolitico a resistenze globulari aumentate. La Settimana Medica, 34, 124, 1946.
3. CARCASSI, U., CEPPELLINI, R., SINISCALCO, M.: Il tracciato elettroforetico dell'emoglobina per una migliore discriminazione della talassemie. Haematologica, 42, 1635, 1957.
4. CEPPELLINI, R.: L'emoglobina normale A_2 : variazioni quantitative in soggetti normali e talassemici. Trasfusione Sanguine, 1, 1, 1956.
5. CEPPELLINI, R.: Il problema genetico delle emoglobinopatie ereditarie, Atti XIV Congresso Soc. Ital. Ematologia. Roma, ottobre 1956.
6. CEPPELLINI, R.: La natura dei geni Rh in Ceppellini R., Nasso S., Tezilacich A. La Malattia Emolitica del Neonato, Ed. I. S. M. Milano, 1952.
7. DEMEREC, M., BLOMSTRAND, I., DEMEREC Z. R.: Evidence of complex loci in Salmonella. Proc. Nat. Acad. Science, U. S. A., 41, 359, 1955.
8. GERALD, P. S., DIAMOND, L. K.: The diagnosis of Thalassaemia trait by starch block electrophoresis of the hemoglobin. Blood, 13, 61, 1958.

9. — — A new hereditary hemoglobinopathy (the Lepore trait) and its interaction with Thalassemia trait. *Blood*, 13, 835, 1958.
10. JOSEPHSON, A.: Discussione alla conferenza sull'Emoglobina organizzata dal National Research Council, Washington D. C., 2-3 maggio 1957.
11. KUNKEL, H. G., BEARN, A. G.: Minor Hemoglobin components of normal human blood. *Fed. Proceed.* 16, 760, 1957.
12. KUNKEL, H. G., CEPELLINI, R., DUNN, L., FIRSCHEIM, L.: in preparazione, 1958.
13. KUNKEL, H. G., CEPELLINI, R., MUELLER-EBERHARD, V., WOLF, J.: Observations on the minor basic hemoglobin component in the blood of normal individual and patients with thalassemia. *J. Clin. Investigation*, 36, 1615, 1957.
14. KUNKEL, H. G., WALLENUS, G.: New hemoglobin in normal adult blood. *Science*, 122, 1955.
15. MARINONI, G., BERNASCONI, C.: L'emoglobina dei talassemici. Ed. *Haematologica*, Pavia, 1957.
16. MOTULSKY, A. G.: Genetic and haematological significance of haemoglobin H. *Nature*, 178, 1055, 1956.
17. SCHWARTZ, H. C., SPAET, T. H., ZUELZER, W. W., NEEL, J. V., ROBINSON, A. R., KAUFMAN, S. F.: Combinations of hemoglobin G, hemoglobin S and Thalassemia occurring in one family. *Blood*, 12, 238, 1957.
18. SMITH, E. W., TURBERT J. V.: Study of two abnormal Hemoglobins with evidence for a new genetic locus for hemoglobin formation. *Bull. J. Hopkins Hosp.*, 102, 38, 1958.
19. SILVESTRONI, E., BIANCO, I.: La malattia microdrepanocitica. Ed. *Il Pensiero Scientifico*, Roma, 1955.
20. — — Sull'esistenza nella popolazione italiana di soggetti non microcitemici portatori di una elevata quota di Hb adulta lenta (A₂) e sui loro rapporti con i malati di anemia microcitica. *Policlinico, sez. prat.*, 64, 1957.
21. — — Associazione di Hb G e microcitemia in due membri di una famiglia italiana del ferrarese. *Policlinico, sez. prat.*, 55, 203, 1958.
22. SILVESTRONI, E., BIANCO, I., MODIANO, G.: Sul valore discriminante dell'Hb A₂ tra soggetti normali e microcitemici. *Progresso Medico*, 13, 772, 1957.
23. SILVESTRONI, E., BIANCO, I., MUZZOLINI, M.: Prime osservazioni su elettroforesi in piastra di amido di emoglobina normale e microcitemica. *Progresso Medico*, 13, 673, 1957.
24. SILVESTRONI, E., BIANCO, I., MUZZOLINI, M., MODIANO, G., VALLISNERI, E.: Studio biochimico, elettroforetico e spettrofotometrico dell'emoglobina di malati di anemia microcitica costituzionale e di morbo di Cooley. *Progresso Medico*, 13, 705, 1957.
25. SINISCALCO, M., SMITH, C. A. B.: The discrimination between normals and microcythaemics as a statistical problem. *Proc. V, Internat. Congress Blood Transfusion, Paris*, 1954.
26. STURGEON, P., FINCH, C. A.: Erythrokinesis in Cooley's anemia. *Blood*, 12, 64, 1957.
27. ZUELZER, W. W., NEEL, J. V., ROBINSON, A. R.: *Progress in Hematology: Abnormal Hemoglobins*. Ed. Grune e Stratton, New York, 1956.

RÉSUMÉ

1) L'augmentation de l'Hb A₂ au-dessus de 3% est considérée par l'auteur une manifestation du phénotype thalassémique hétérozygote plus commun (ici indiqué comme *microcytémie typique*, MA), aussi fondamentale que le cortège d'altérations morphologiques et fonctionnelles des érythrocytes. C'est là une affirmation confirmée par le fait que les cas exceptionnels de dissociation entre les deux manifestations: — situation hématologique normale avec A₂ élevée (*mA*) d'une part, et altérations microcytémiques avec niveau normal d'A₂ (*Ma*) d'autre part — présentent dans leur distribution un caractère de familiarité et ne semblent pas dûes à l'expression partielle d'un gène thalassémique typique.

2) La nature monogénique de la variante thalassémique *Ma* (*microcytémie atypique*) est clairement démontrée par l'observation des ségrégations dans 5 croisements *Ma* x *ma* (normal) qui ont donné naissance à 10 enfants *Ma* et à 9 enfants *ma*. Cette même variante s'observe d'ailleurs parmi les consanguins d'un individu atteint d'Hbpathie H, issu d'un croisement *Ma* x *ma*. Puisque d'autres travaux récents confirment nos observations, le rapport entre Hb H et *microcytémie atypique* (relativement rare parmi les thalassémies *sensu lato*) prend une signification étiologique très précise.

3) La nature monogénique de la variante *mA* (*thalassémie normocytaire?*) est pour l'instant plus incertaine pour défaut d'observations. Une famille est décrite toutefois, dont le père et l'un des enfants (issu d'un croisement *mA* x *MA*) appartiennent à la variante *mA*, alors qu'un autre enfant est atteint d'anémie microcytaire constitutionnelle. Le rapport qui relie entre eux ces deux phénotypes relativement rares et que Silvestroni e Bianco avaient déjà remarqué, trouve ainsi une nouvelle confirmation.

4) Les données recueillies jusqu'à présent ne sont pas suffisantes pour décider si les différents types de thalassémie sont les produits de mutations d'un même ou de différents loci. Si toutefois il était prouvé que c'est bien de muta-

SUMMARY

1) An increase of hemoglobin A₂ over 3% is regarded as one of the two fundamental manifestations of the commonest thalassemic mutant in the heterozygous condition i.e. thalassemia minima or *typical microcytemia* (here indicated as MA), while the other element is represented by the characteristic ensemble of the morphological and functional alterations of the erythrocytes. This assumption is based on the fact that the infrequent cases of sharp dissociation between the two elements i.e. *i*) red cells normality with A₂ above 3% (*mA*), and *ii*) microcytemia with normal levels of A₂ (*Ma*), run in families and cannot be easily explained as a partial manifestation of a typical microcytemic gene.

2) The unilocal origin of the *Ma* variant seems to be well proved by the segregations from 5 *Ma* x *ma* (normal) matings where 10 *Ma* and 9 *ma* children have been observed. Moreover this variant has been detected among the relatives of a carrier of Hb H, born from a *Ma* x *ma* mating. This is in agreement with other recently published reports and strongly suggests that the relationship between Hb H and *atypical microcytemia* (with low A₂) has a precise etiological significance.

3) The unilocal origin of the *mA* variant (*normocytic thalassemia?*) is at the moment less firmly established. However a family is described (mating *mA* x *MA*) where the father and one child show the same *mA* phenotype; moreover one other child is affected by constitutional microcytic anemia (*Tb. media*). This finding supports the observations of Silvestroni and Bianco, who have already reported that a number of patients with intermediate thalassemic syndromes are born from *mA* x *MA* matings.

4) At the moment no data exist which enable to decide whether the different thalassemias are mutations of the same or of different loci; however if they shall be shown to be allelic, the hypothesis must be kept in mind that the Thalassemia locus is a complex locus

tions alléliques qu'il s'agit, il faudrait prendre en considération la possibilité que leur *locus* ait une structure complexe, formée de subunités mutationnelles distinctes, responsable chacune d'aspects du phénotype différents mais non indépendants.

5) L'A. décrit l'Hb B₂ récemment identifiée par Kunkel, Ceppellini, Dunn et Firsheim (sous presse) produit d'une mutation au locus *Hb₂* qui est responsable de la synthèse de A₂ et de B₂. La relation d'allélisme entre A₂ et B₂ prouve l'hétérogénéité génétique de l'Hb chez l'adulte normal et peut constituer un modèle pour interpréter l'Hb A même, comme génétiquement hétérogène malgré son homogénéité chimique apparente.

6) L'A. termine en soulignant l'hétérogénéité phénotypique et génotypique de syndromes génériquement appelées thalassémies et qui intéressent des processus métaboliques voisins. Le terme général de *thalassémie* semble pouvoir s'adopter pour indiquer tous les défauts héréditaires qui agissent sur l'Hbgenèse sans toutefois provoquer la production d'Hb anormale spécifique.

with more than one mutation sides, responsible for different but correlated aspects of the phenotype (red cell structure and A₂ level).

5) The new hemoglobin B₂ is described which has been recently identified by Kunkel, Ceppellini, Dunn and Firsheim (unpublished data). Reasons are given for regarding B₂ as the product of a mutation at the locus which is responsible for the synthesis of A₂ (locus *Hb₂*). The relationship of allelism between A₂ and B₂ is a proof of the genetic heterogeneity of the hemoglobin of the normal adult and may be taken as a model suggesting the genetic heterogeneity of hemoglobin A, notwithstanding its apparent chemical omogeneity.

6) It is concluded that the conditions generally indicated as Thalassemsias represent a genetically heterogeneous group, which have nonetheless to do with related metabolic processes. It is therefore suggested that the term *Thalassemia* may be mantained for indicating all hereditary defects which directly interfere with hemoglobinogenesis although not producing a specific abnormal hemoglobin.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Der Verfasser ist der Ansicht, dass die Erhoehung der normalen, langsamen A₂ Haemoglobin (über 3%), zusammen mit dei mikrozythaemischen Erscheinungen der roten Blutkoerper, ein grundlegendes Element des gewoehnlichen thalassaemischen heterozygoten Phenotypen darstellen (*typische Mikrozythaemie*, hier kurz als *MA* bezeichnet). Dies wird dadurch bestaetigt, dass die wenigen Faelle von Trennung zwischen den beiden Elementen i) haematologische, normale Erscheinung mit erhoelter A₂ (*mA*), ii) mikrozythaemische Alterationen mit nicht erhoelter A₂ (*Ma*) sind von erblicher Natur und scheinen nicht einem parzialen Ausdrucke eines typischen thalassaemischen Genes zuzuschreiben zu sein.

2) Der monogene Erbgang der *Ma* Variante, *atypische Mikrozythaemie*, erscheint deutlich durch die Segregationen in 5 Ehen *Ma* x *ma* (normal) bewiesen, welche 10 Kinder *Ma* und 9 Kinder *ma* erzeugt haben. Diese gleiche Variante erscheint ausserdem in den Blutverwandten eines Probanden mit Haemoglobinopatie H, geboren aus einer Ehe *Ma* x *ma*. Da auch andere neueste Bemerkungen der Literatur diesen Befund bestaetigen, bekommt somit die Beziehung zwischen Haemoglobin H und *atypische Mikrozythaemie* (*Ma*) eine ganz bestimmte eziologische Bedeutung.

3) Der monogene Erbgang der *mA* Variante (*normozytische Thalassaemie*) ist zur Zeit noch unsicher, da nicht genug Angaben dafuer vorhanden sind. Eine Familie ist beschrieben, in welcher die *mA* Variante wieder erscheint und zwar im Vater und in einem der Soehne (Ehe

mA x MA); ein anderer Sohn leidet an einer konstitutionellen mikrozythaemischen Anaemie. Somit wird, was auch schon von Silvestroni und Bianco bemerkt wurde, die pekuliaere Beziehung zwischen diesen zwei relativ seltenen Phenotypen bestaetigt.

4) Zur Zeit existieren keine genuegende Angaben um zu entscheiden ob die verschiedenen thalassaemischen Typen von Mutationen von einem gleichen oder von verschiedenen Loci hervorgerufen werden.

Sollte jedoch bewiesen werden, dass sie alle'isch sind, muss man die Moeglichkeit im Auge behalten, dass der Locus von komplexer Art sein koennte, mit verschiedenen, funktionellen und wechselbaren Untereinheiten die verantw ertlich fuer die verschiedenen aber fisiologisch zusammenhaengenden Ausdruecke des Phenotyp en sind.

5) Man beschreibt die Haemoglobin B₂, vor kurzem von Kunkel, Ceppellini, Dunn und Firsheim identifiziert, welche als das Produkt einer Mutation zum Locus (*Hb₂*) anzusehen ist, Locus der fuer die Synthesis von A₂ verantwortlich ist. Die Beziehung von Allelismus zwischen A₂ und B₂ beweist die genetische Heterogeneitaet des emoglobinischen Bildes des normal Erwachsenen und kann als Modell genommen werden um auch die A Haemoglobin als genetisch heterogen zu interpretieren, trotz ihrer scheinbar chemischen Gleichartigkeit.

6) Schliessend unterzeichnet der Verfasser die phaenotypische und genotypische Gleichartigkeit der Syndrome die allgemein als Thalassaemien bezeichnet werden. Trotzdem ist es sehr wahrscheinlich dass diese zusammenhaengende metabolische Prozesse interessieren. Man schlaegt deshalb vor die allgemeine Terminologie der Thalassaemien anzuwenden, um all die Erbkrankheiten zu bezeichnen die direkt mit der Haemoglobin zusammenhaengen, obwohl sie nicht mit der Produktion von spezifischer abnormen Haemoglobin zum Ausdruck kommen.