

PROGETTO <<IPERFERRITINEMIE “SENZA FERRO”>>

Premesse.

La ferritina è una proteina presente ubiquitariamente in tutte le cellule e in tutti i sistemi viventi, la cui funzione principale è quella di fungere da deposito del ferro, proteggendo così le cellule e i tessuti dal potenziale effetto tossico del ferro [1]. La sintesi di ferritina è soggetta ad un controllo molteplice: ferro-dipendente e ferro-indipendente. Il primo sistema di regolazione avviene a livello post-trascrizionale e permette alla cellula di regolare la produzione di ferritina in funzione del contenuto cellulare di ferro[1]. Il secondo è prevalentemente trascrizionale ed è regolato da diversi fattori tra cui i più importanti sono gli stati infiammatori, alcool e alcuni ormoni. Una piccola quota di ferritina viene attivamente secreta nel sangue in quantità proporzionale alla ferritina. L'epatocita e soprattutto i macrofagi (sedi principali di deposito del ferro) sono le cellule che più contribuiscono alla secrezione di ferritina. Elevati livelli di ferritina sierica sono frequenti in diverse situazioni cliniche caratterizzate da sovraccarico di ferro e molte situazioni in cui l'incremento è indipendente dallo stato del ferro (vedi Allegato 1) [tratto da Percorso diagnostico terapeutico dell'emocromatosi – Regione Lombardia - <http://malattierare.marionegri.it/content/view/123>]

Tra le cause genetiche della iperferritinemia ci sono quelle associate a cataratta precoce che includono mutazioni private nella regione IRE nell'5'UTR del gene della L-ferritina, responsabile per la sindrome ereditaria di cataratta iperferritinemia (HHCS) [2]. Tuttavia, esistono anche pazienti in cui gli alti livelli di ferritina sierica non si associano né ad elevata saturazione di transferrina, né un sovraccarico epatico, né alla presenza di cataratta. Dopo la pubblicazione di un articolo di un gruppo di ricercatori francesi [3], l'attenzione si è spostata sull'ipotesi che alcune di queste forme di iperferritinemie possano dipendere da un difetto nella secrezione della ferritina da parte dei macrofagi e/o epatociti [4].

Sempre più spesso, anche se non in un numero consistente, giungono all'attenzione dell'Ambulatorio del Metabolismo del Ferro questi soggetti che dopo accurata valutazione risultano presentare un'iperferritinemia non spiegata. Alcuni di questi sottoposti altrove a salassoterapia hanno messo in evidenza come i valori di ferritina si riducessero rapidamente dopo la rimozione di una modesta (normale) quantità di ferro, a dimostrazione del fatto che non presentavano un reale sovraccarico di ferro e che la ferritina era comunque sotto il controllo (seppur sproporzionato) del ferro cellulare. Alcuni di questi casi presentano una familiarità tra fratelli (ma non con i genitori), dato che supporta l'ipotesi che l'iperferritinemia, in questi casi, sia legata ad un difetto genetico di tipo recessivo al momento ignoto. Queste condizioni di iperferritinemia rimangono così oggi indefinite.

Obiettivi.

Definire i meccanismi di incremento della ferritina in questi casi ed arrivare a definirne le cause molecolari. La comprensione di questi casi estremi oltre alla possibilità di chiarire i meccanismi oggi non noti attraverso cui la ferritina viene secreta dalle cellule macrofagiche ed epatocitarie, potrebbe condurre a comprendere anche condizioni assai più frequenti caratterizzate da iperferritinemia non definita, quali per esempio quelle associate agli stati dismetabolici. E' infatti possibile che condizioni acquisite possano andare ad interferire sul meccanismo molecolare di secrezione della ferritina così come è possibile che difetti genetici lievi o presenti allo stato di eterozigosi possano favorire l'iperferritinemia in tali condizioni. E' noto infatti che solo una parte dei soggetti con dismetabolismo sviluppano un'iperferritinemia che spesso sovrastima il reale contenuto di ferro e le ragioni di ciò non sono ad oggi chiarite. La possibilità di identificare un difetto molecolare potrebbe permettere di verificare questa ipotesi e condurre allo sviluppo di un test in grado di identificare tali condizioni riducendo la necessità di indagini più complesse e dispendiose.

Metodologia.

L'ipotesi di lavoro è che se queste forme di iperferritinemia sono dovute ad un difetto della secrezione cellulare di ferritina (secrezione aumentata) dovrebbero presentare una discrepanza tra contenuto cellulare di ferritina e ferritina sierica. Poiché non è possibile accedere alle cellule epatiche o ai macrofagi, abbiamo pensato di utilizzare come rappresentanti significativi le cellule del sangue: eritrociti e linfo-monociti. Studi precedenti hanno evidenziato l'esistenza di una relazione tra ferritina contenuta nelle cellule del sangue e la ferritina a livello epatocellulare in pazienti con diverse condizioni patologiche e diverso stato del ferro [5].

Verranno studiati un minimo di 10 pazienti con iperferritinemia non specificata con particolare riguardo ai casi familiari. I risultati ottenuti verranno comparati con 10-15 soggetti sani comparabili per sesso ed età.

In particolare, in laboratorio, si effettuerà la separazione dal sangue intero, le cellule candidate, i globuli rossi ed i linfo-monociti mediante gradiente di Ficoll. Questi campioni saranno poi analizzati dal gruppo del San Raffaele con cui collaboriamo per misurare la ferritina L ed H in rapporto al contenuto proteico.

Per quello che riguarda invece la parte fenotipica, verranno analizzati gli indici dello stato del ferro sia nei pazienti (dato già disponibile) e nei soggetti di controllo selezionati in modo di aver la conferma della loro normalità rispetto agli indici del ferro. Nei pazienti verrà inoltre eseguito il sequenziamento delle regioni regolatrici della ferritina e dell'intero gene della ferritina L ed H per escludere l'esistenza di mutazioni di tali geni come osservato nello studio originale francese.

Nel caso si dovesse identificare una chiara discrepanza tra il contenuto di ferritina nelle cellule e nel siero nei pazienti rispetto ai controlli si valuterà se procedere ad ulteriori indagini volte ad identificare il possibile difetto molecolare sottostante. A tale proposito si potrà valutare la possibilità di analizzare le coppie di fratelli affetti per uno studio che potrebbe richiedere indagini molecolari avanzate quali analisi di varianti genetiche estese a tutto il genoma o alle regioni contenenti il gene della ferritina oppure eseguire una analisi di sequenziamento genomico. Questa parte del progetto potrebbe costituire una fase successiva della ricerca che si valuterà in un tempo successivo.

Previsioni di spesa.

1. Definizione fenotipica dei controlli per i seguenti esami: sideremia, transferrina, ferritina, ALT, PCR, emocromo.
2. Reagenti di laboratorio per separazione cellule, analisi di sequenziamento della regione IRE della L-ferritina, sequenziamento della ferritina L ed H
3. Analisi ed elaborazione dati
4. Presentazione risultati a Congressi nazionali e/o internazionali

DESCRIZIONE	COSTO
Analisi biochimiche (punto 1)	500 euro
Altre analisi (punto 2)	2000 euro
Prestazione occasionale per analisi ed elaborazione dati (punto 3)	2000 euro
Spese varie (presentazione dati a congressi, punto 4)	1000 euro
Totale	5500 euro

Bibliografia

1. Wang J, Pantopoulos K. Biochem J. 2011;434(3):365-81.
 2. Cazzola M, Skoda RC. Blood. 2000;95(11):3280-8.
 3. Kannengiesser C *et al.*, Haematologica 2009; 4:335-9
- [REF] vedi manoscritto
4. Jayantha A *et al.* World J Gastroenterol 2010;16(28):3541-5.
 5. Cazzola *et al.* Blood. 1983;62:1078-87.

Allegato1

CAUSE DI IPERFERRITINEMIA ISOLATA CON O SENZA SOVRACCARICO DI FERRO

CAUSE	COMMENTI
Stati infettivi, infiammatori acuti e cronici	La ferritina è una proteina di "fase acuta". Sono alterati altri indici infiammatori. La sideremia e la transferrina sono ridotte.
Neoplasie	Particolarmente alti i valori di ferritina nei tumori ematologici. Sono alterati altri indici infiammatori. La sideremia e la transferrina sono ridotte.
Sindrome iperferritinemia-cataratta	Malattia autosomica dominante da alterata regolazione della sintesi di L-ferritina. E' presente una cataratta precoce (prima dei 50 anni) nel probando e, quasi sempre, nella famiglia (sono riportati rari casi sporadici); la diagnosi può essere clinica se c'è cataratta e iperferritinemia familiare ed è confermata con l'analisi di sequenza della regione IRE (iron responsive element) del gene della L-ferritina.
Abuso alcolico	L'alcool stimola la sintesi di ferritina e danneggia le cellule epatiche. E' utile ricontrollare i valori dopo periodo di astensione.
Necrosi tissutale soprattutto epatocellulare	La necrosi libera la ferritina contenuta nelle cellule. Gli indici di necrosi cellulare sono alterati. La sideremia può talvolta essere elevata. Tutte le cause di epatite acuta e cronica possono determinare valori di ferritina sierica elevata senza che necessariamente ciò sia associato ad un reale sovraccarico di ferro.
Epatite cronica di varia eziologia	In circa il 30-50% delle epatiti croniche (alcolica, virali, autoimmuni e metaboliche) si può riscontrare un aumento della ferritina con o senza un aumento della saturazione della transferrina. In molti casi la biopsia epatica rivela la presenza di un sovraccarico di ferro lieve-moderato a distribuzione generalmente mista (epatociti e cellule di Kupffer).
Iperferritinemia associata agli stati dismetabolici Dysmetabolic Hepatic Iron Overload Syndrome (DHIOS) Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD)	La presenza di alterazioni facenti parti della sindrome metabolica si associa frequentemente alla presenza di iperferritinemia. La presenza di sovraccarico di ferro di entità lieve-moderata è frequente e va stabilita con precisione (Riva A. et al, 2008; Valenti L et al., 2010). E' opportuno quindi mettere in atto tutte le indagini volte a definire lo stato dismetabolico (compresa la valutazione del rischio cardiovascolare associato) e a correggerlo adeguatamente prima di intraprendere una terapia per rimuovere il ferro in eccesso.
Emocromatosi tipo 4 A (deficit di ferroportina)	Questa forma di emocromatosi è caratterizzata da una marcata iperferritinemia con saturazione della transferrina normale o ridotta. Il sovraccarico di ferro è prevalentemente localizzato nei macrofagi (cellule di Kupffer nel fegato). Nelle fasi più avanzate il sovraccarico di ferro coinvolge anche gli epatociti e la saturazione della transferrina può aumentare simulando, di fatto, la forma classica di emocromatosi.
Aceruloplasminemia	Rara forma di sovraccarico di ferro sistemico che coinvolge encefalo, fegato, pancreas in particolare. Dal punto di vista biochimico è caratterizzata da iperferritinemia, saturazione della transferrina ridotta e lieve anemia microcitica.