

# FISIOLOGIA, IDENTIFICAZIONE CITOMORFOLOGICA E CRITERI VALUTATIVI DELLE CELLULE EMATOPOIETICHE DEL MIDOLLO OSSEO

**CLAUDIO PETTERINO**

*Dottore di Ricerca in Medicina Interna Veterinaria, Specialista in Tossicologia - Prof. Associato in Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria - Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria  
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Padova - AGRIPOLIS - Legnaro (PD)*

**CLAUDIO CAPURRO**

*Medico Veterinario  
Laboratorio di Oncologia Comparata IST - Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro - Genova*

**MASSIMO CASTAGNARO**

*Prof. Ordinario, Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria - Diplomato ECVF  
Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria  
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Padova - AGRIPOLIS - Legnaro (PD)*

## Riassunto

Le cellule del sangue svolgono notevoli ed importanti funzioni vitali per l'organismo animale. Tutte le linee cellulari hanno un'origine comune, la cellula staminale pluripotente del midollo osseo, e sono fra loro coordinate ed intercorrelate durante l'ematopoiesi. Il microambiente (componente cellulare costituita dalla cellula staminale e dalla cellula stromale, e i fattori di crescita) gioca un ruolo critico nel mantenimento dell'immortalità della cellula staminale pluripotente, nella regolazione della differenziazione nelle diverse linee e nell'attività delle cellule progenitrici. Mentre può risultare relativamente semplice identificare le tipiche cellule di ciascuna linea cellulare, deve essere ricordato che in ciascuna linea cellulare maturativa esistono graduali cambiamenti da una forma cellulare alla successiva, e ciò non ne rende sempre facile la precisa identificazione. La citochimica rappresenta un'indagine utile per dimostrare la presenza intracellulare di sostanze o di attività enzimatiche e la loro localizzazione. Mediante questa metodologia è possibile identificare le differenti linee cellulari nelle condizioni fisiologiche e patologiche.

## Summary

*The cells of the blood provide a numerous and important vital functions for the animal organism. All the cell lines share a common origin, the pluripotent stem cell of the bone marrow, are interrelated and coordinated during haematopoiesis. The microenvironment (stem cell, stromal cell, and growth factors) plays a critical role in maintaining the immortality of the pluripotential stem cells, regulation of differentiation in different cell lines and in regulating progenitor cell activity. Whilst it is fairly easy to illustrate and identify typical cells of any given type, it must be remembered that in any cell maturation line, there is a gradual change from one form to another. Thus, the dividing line is not always clear and simple. Cytochemistry provides significant tools to demonstrate the intracellular presence of chemical compounds and to assess the enzymatic properties as well as their cellular localization. By this methodology it is possible to recognize the different cell lines in physiologic and pathologic conditions.*

## CONSIDERAZIONI GENERALI

Sebbene l'esame citologico del midollo osseo non sia una pratica comune spesso, può consentire di ottenere maggiori informazioni relative alle alterazioni osservabili

nel sangue periferico ed individuabili dall'esame emocromocitometrico. La corretta valutazione delle condizioni patologiche esige comunque una buona conoscenza delle caratteristiche citomorfologiche normali delle molteplici e differenti linee cellulari osservabili in un preparato citologico di midollo osseo.

Il midollo osseo rosso è un tessuto ad elevata cellularità e specializzato nella produzione delle cellule del sangue costituite dai globuli rossi, globuli bianchi e piastrine. Il

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 19/5/2001 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 19/7/2001”.

processo di ematopoiesi ha inizio già nelle fasi di vita intrauterina durante la quale si svolge a livello del sacco vitellino e viene successivamente trasferito nel tessuto epatico, splenico e nel midollo osseo. Sebbene dopo la nascita i processi di ematopoiesi si svolgano in particolare a livello del midollo osseo rosso, il fegato e la milza mantengono il loro potenziale ematopoietico (ematopoiesi extramidollare)<sup>1</sup> costituendo una riserva funzionale che l'organismo animale utilizza in determinate condizioni di emergenza (anemia acuta, anemia emolitica, insufficienza midollare).

Alla nascita, in alcune specie (cane, coniglio e nell'uomo) il tessuto ematopoietico occupa tutto lo spazio midollare ma con l'età tende a limitarsi progressivamente solo alle epifisi delle ossa lunghe, delle vertebre, dello sterno e delle costole, dell'ileo e delle ossa della volta cranica<sup>2</sup>. Nel ratto e nel topo il tessuto ematopoietico funzionante occupa essenzialmente lo spazio midollare indipendentemente dall'età<sup>3</sup>.

Nel midollo osseo possiamo identificare due principali compartimenti isto-fisiologici che sono quello rappresentato dal tessuto ematopoietico proprio e il compartimento vascolare. Quest'ultimo è composto di un sistema di seni venosi affiancato a vasi arteriosi ma meno rappresentati. Le pareti dei seni vascolari sono costituite da cellule endoteliali e da una membrana basale oltre la quale è possibile identificare cellule reticolari di origine fibroblastica. Queste svolgono un importante ruolo di supporto per le strutture vascolari ma anche per le cellule del tessuto ematopoietico contribuendo alla costituzione di un microambiente a loro ideale. Infatti oltre ai fattori di crescita, anche le interazioni intercellulari svolgono un ruolo importante nel sostentamento e nei processi differenziativi delle cellule delle differenti linee ematopoietiche.

Le cellule che stanziano nel midollo osseo e che ivi evolvono attraverso differenti stadi evolutivi svolgono tutte importantissime e vitali funzioni per l'organismo. In linea generale si distinguono tre serie cellulari che sono la serie eritrocitaria, la serie leucocitaria e quella megacariocitaria. Dalla prima derivano gli eritrociti che grazie al loro contenuto emoglobinico sono deputati al trasporto dell'ossigeno e alla rimozione della CO<sub>2</sub> dai differenti distretti tissutali. I leucociti della serie granulocitaria, che si differenziano in tre sottoipi cellulari (neutrofili, eosinofili, basofili) rappresentano un baluardo difensivo non specifico contro agenti aggressori per l'organismo e sono coinvolti in differenti ed importanti processi di difesa (fagocitosi, mediazione dei processi infiammatori di varia natura, reazioni allergiche). I leucociti della serie monocitaria che sono anch'essi deputati a svolgere attività di tipo difensivo, fagocitario (e non solo di agenti infettivi) e a partecipare alla regolazione di alcuni processi infiammatori. Infine le cellule della linea megacariocitaria giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi di emocoagulazione e di mantenimento dell'integrità vasale. È interessante però come tutte queste differenti linee cellulari con differenti ruoli biologici derivino da un'unica cellula pluripotente (PSC - Cellula Staminale Pluripotente) che a livello midollare è sottoposta a stimoli differenziativi e microambientali che inducono alla formazione di una serie cellulare piuttosto che l'altra. La PSC rappresenta nel complesso un piccolo compartimento nell'universo cellulare del midollo osseo, dalla quale però derivano le varie CFU (Unità Formanti Colonia) che daranno poi origine alle differenti linee cellulari ematiche (Fig. 1).

Le cellule progenitrici sono sotto l'effetto di uno svariato numero di fattori stimolanti chiamati nel complesso CSF (Fattore Stimolante Colonie) che supportano metabolicamente la crescita di specifiche linee cellulari in un delicato e preciso equilibrio. Sotto l'effetto di molteplici stimoli le cellule pluripotenti vengono commissionate a formare unità di cellule progenitrici delle differenti linee cellulari. Tra queste si formano le BFU-E (Burst Forming Unit) che daranno origine a colonie cellulari dei precursori eritroidi chiamate a loro volta CFU-E (Unità Formanti Colonie - Eritroidi). Il termine BFU-E deriva dal fatto che le cellule primitive eritroidi costituenti tale unità possono dare origine a sottocolonie multiple in colture cellulari in prove sperimentali condotte in vitro<sup>4</sup>. Dalle CFU-E origineranno colonie più piccole di cellule eritroidi la cui prima fase cellulare citologicamente differenziabile è il proeritroblasto. Per la serie leucocitaria (mieloide e monocitaria) le cellule formanti le colonie progenitrici multipotenti sono state definite CFU-GM (Unità Formanti Colonie - Granulociti/Macrofagi) e CFU - M (Colonie Formanti Colonie - Macrofagi). La linea megacariocitaria deriva da colonie cellulari definite CFU-Meg (Unità Formanti Colonie - Megacariociti).

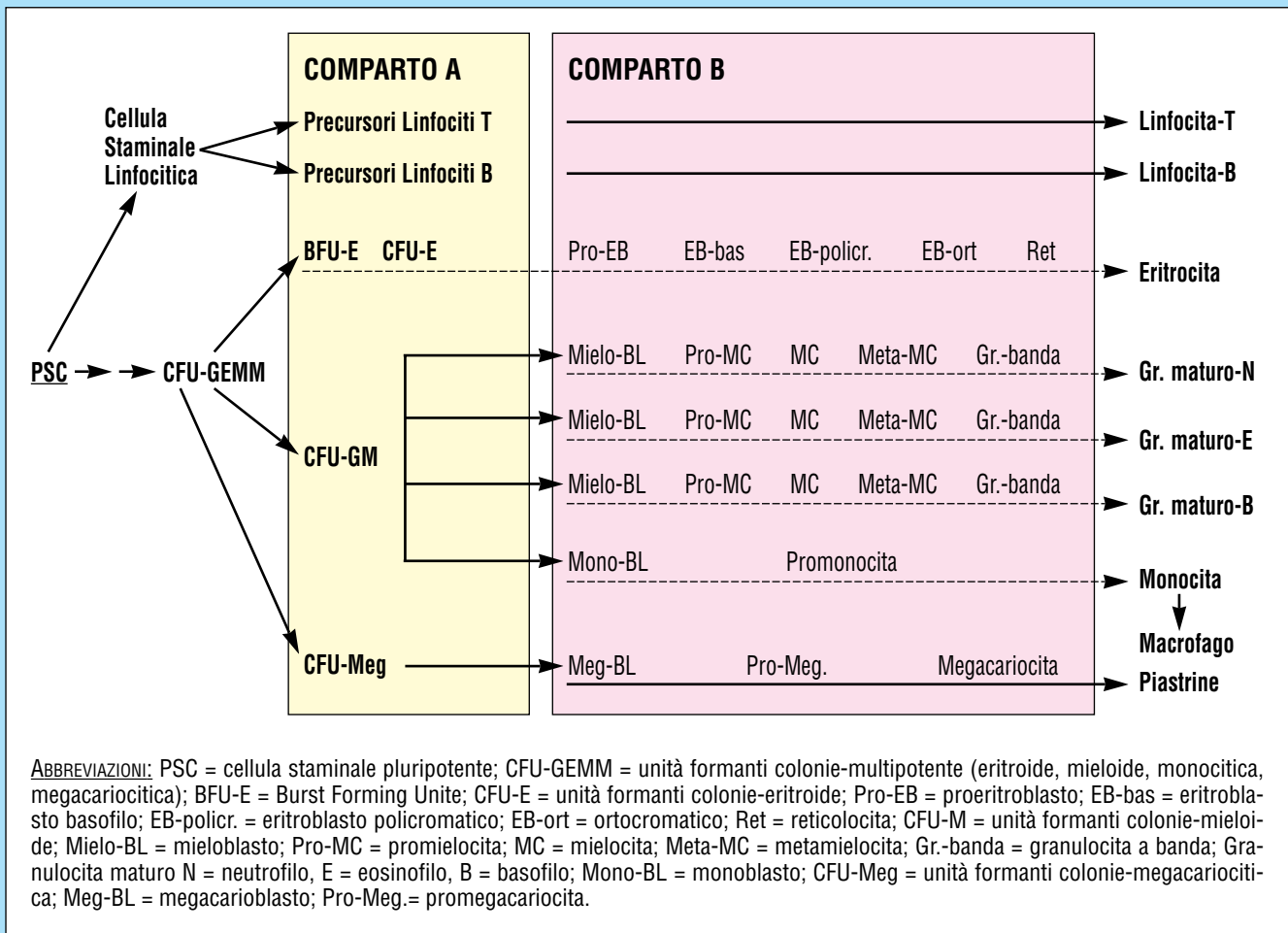
Le cellule della linea linfoide derivano invece dalla cellula staminale linfoide che si differenzia poi in due diverse linee che rappresenteranno i linfociti pre-B e i linfociti pre-T che sono i progenitori rispettivamente dei linfociti B e dei linfociti T.

Tutto questo mondo cellulare in costante fermento e attiva evoluzione è supportato da un microambiente che svolge una funzione di sostegno strutturale tridimensionale intrecciato con un delicato network in cui un fondamentale ruolo è giocato da una serie di sostanze ad attività biologica con attività stimolante e soppressoria sulla proliferazione e differenziazione delle varie linee cellulari attraverso le loro fasi evolutive. I fattori di crescita rappresentano un insieme di molecole che svolgono attività stimolatoria cellulare e sono contrastati dall'altra parte da un gruppo di sostanze endogene o esogene (ad esempio i farmaci chemioterapici) che svolgono invece un ruolo inibitorio (Tab. 1)<sup>5</sup>.

La valutazione del midollo osseo viene generalmente richiesta per l'identificazione di anomalie della sfera ematica che non sono facilmente identificabili mediante l'esame emocromocitometrico o altri segni clinici e risultati di ulteriori indagini diagnostiche che facciano sospettare un qualche interessamento midollare. In linea generale tale esame può essere richiesto in caso di anemie non rigenerative, nelle leucopenie persistenti (in particolare nella neutropenia) e nei casi di trombocitopenia<sup>6</sup>. Esistono però anche altre indicazioni che possono richiedere tale esame come nel caso si sospettino infezioni specifiche i cui agenti causali appartengano ai generi *Leishmania*, *Histoplasma*, *Toxoplasma* e nei sospetti di coinvolgimento neoplastico del midollo osseo in presenza di neoplasie primarie o metastatiche<sup>6</sup>.

## LA SERIE ERITROIDE

La funzione degli eritrociti maturi circolanti è quella di trasportare l'O<sub>2</sub> a livello tissutale e da qui rimuovere la CO<sub>2</sub> prodotto finale dei processi di respirazione cellulare. In realtà a livello del globulo rosso vengono svolti altri im-



**FIGURA 1 -** Diagramma schematico dell'ematopoiesi. La capacità auto-rigenerante è massima nel pool cellulare delle PSC e diminuisce progressivamente nel pool delle CFU (COMPARTO A). Per contro la capacità proliferativa è minima nei pool delle PSC e aumenta progressivamente negli stadi successivi rappresentati dalle CFU e dai rappresentanti in differenziazione delle differenti linee cellulari (COMPARTO B) nei quali poi diminuisce fino ad esaurirsi (Hasheck and Rosseaux 1998, modificato).

portanti processi cellulari e biochimici. Con eccezione delle specie ittiche, degli anfibi e degli uccelli in cui le cellule mature di questa linea mantengono una distinguibile struttura nucleare, i mammiferi perdono il nucleo e generalmente si osservano nel sangue circolante come strutture anucleate. Il tempo necessario alla maturazione dal proeritroblasto al reticolocita nel cane è di circa 7 giorni<sup>7</sup>. La vita media dei globuli rossi circolanti è variabile da una specie animale all'altra, con un minimo di 25 giorni nel topo, 50-60 giorni nel ratto, gatto e criceto, fino a 110-120 giorni nel cane e nell'uomo<sup>5</sup>. Per questa linea cellulare la milza rappresenta la principale sede di distruzione (emocateresi).

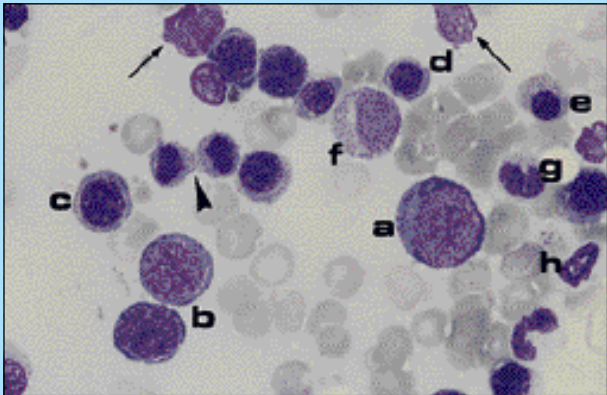
Lo sviluppo delle cellule della serie eritroide si evolve in piccole strutture denominate isole eritroblastiche che si organizzano alla periferia di una cellula spesso denominata *cellula nutrice* e che corrisponde ad un macrofago (Fig. 5). La cellula nutrice svolge funzioni multiple: a) funziona da cellula di riserva e di stoccaggio del ferro utilizzato per la sintesi dell'emoglobina, b) fagocita i nuclei estrusi dagli eritroblasti ortocromatici e delle cellule anziane, c) sostentamento per le cellule eritroidi. Quindi nel complesso partecipa alla costituzione di un microambiente di sviluppo ideale per le cellule di questa linea cellulare.

La prima cellula identificabile citomorfologicamente e derivante dalla CFU-E è rappresentata dal proeritroblasto

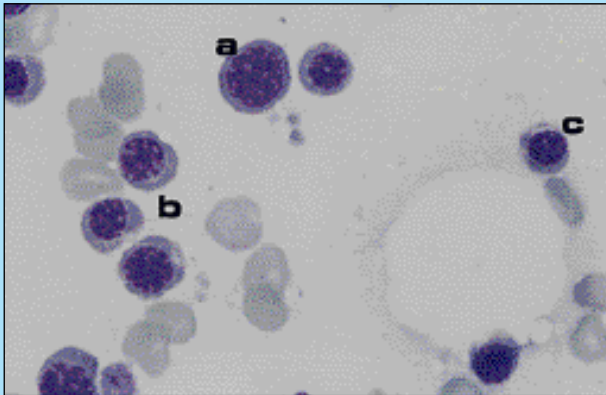
(rubriblasto o pronormoblasto) (Fig. 2). Questa cellula è caratterizzata dall'essere abbastanza voluminosa (20-25  $\mu\text{m}$  ca.), rotonda, con scarso citoplasma di colore blu-intenso. Il nucleo rotondo, presenta 1 o 2 nucleoli e cromatina finemente punteggiata. Dal proeritroblasto deriva l'eritroblasto basofilo (prorubricita, eritroblasto precoce, normoblasto rubricita o normoblasto basofilo) (Fig. 2, 3, 6A) di dimensioni leggermente inferiori (16-18  $\mu\text{m}$  ca.), con nucleo leggermente più piccolo, e il citoplasma appare proporzionalmente aumentato (diminuito rapporto N/C). Il nucleo diviene più basofilo, la cromatina nucleare si presenta organizzata in zolle e i nucleoli possono essere o meno evidenziabili. Segue quindi l'eritroblasto policromatofilo (normoblasto intermedio, rubrocita policromatofilo, normoblasto policromatofilo precoce) (Fig. 2, 3, 6B) nel quale inizia ad essere evidenziabile la produzione di emoglobina che conferisce una colorazione policromatica alla componente citoplasmatica della cellula. La cellula (12-15  $\mu\text{m}$  ca.) è ancora più piccola se confrontata con i suoi progenitori con un nucleo che appare sempre più piccolo, condensato e nel quale non sono ormai più evidenziabili i nucleoli. L'ultima tappa di questa linea in cui è ancora evidenziabile il nucleo è rappresentata dall'eritroblasto ortocromatico (rubrocita normocromica, rubrocita ortocromica) (Fig. 2, 3, 6B) che presenta un citoplasma ro-

**Tabella 1**  
Vengono indicate sinteticamente le principali molecole ad effetto stimolatorio ed inibitorio sulle differenti linee cellulari ematopoietiche (Brown 1998, modificato)

TAPPE EVOLUTIVE	STIMOLATORI	INIBITORI
Differenziazione delle cellule staminali	HIM Microambiente inducente l'ematopoiesi	
Eritropoiesi	IL-3 Eritropoietina IL-9 Macrofagi PGE1, PGE2, PGI2 Fattore stimolante eritropoietico Fattore eritroblasto-stimolante Androgeni Corticosteroidi GH Tiroxina Cobalto GM-CSF GM-CSF, G-CSF	Estrogeni Litio FeLV Linfociti T suppressor
Granulopoiesi	IL-3 Eosinofilo-, basofilo-poietina Litio PGI2 corticosteroidi	Fattore inibente le colonie Caloni Lattoferrina Transferrina Isoferritina acidica Alcune linfochine PGE1 e PGE2 Prodotti di origine macrofagica PGE1 e PGE2, corticosteroidi
Monocitopoiesi	M-CSF, GM-CSF Monocitopoietina IL-3, IL-11	
Megacariocitopoiesi	Meg-CSF Trombopoietina Ferro Litio	Fattore splenico Ferro in differenti qauntità
Linfopoiesi	IL-3, IL-11 Microambiente specifico Ormoni timici Antigeni IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, Il-6, IL-7, IL-11, IL-12, TNF $\alpha$ Interferone T-cell growth factor	Corticosteroidi



**FIGURA 2** - Midollo osseo, cane: si osserva un eritroblasto in citodiemesi ( $\blacktriangleright$ ) due elementi non identificabili ( $\rightarrow$ ), elementi cellulari eritroidi (**a** proeritroblasto, **b** eritroblasti basofili, **c** eritroblasto policromatofilo, **d** eritroblasto ortocromatico, **e** eritroblasto ortocromatico tardivo) e mieloidi (**f** mielocita neutrofilo, **g** metamielocita neutrofilo, **h** granulocita neutrofilo segmentato maturo) in differenti stadi evolutivi. Diff-Quik, elevato ingrandimento.



**FIGURA 3** - Midollo osseo, cane: si osservano elementi cellulari eritroidi in differenti stadi evolutivi (**a** eritroblasto basofilo, **b** eritroblasti policromatofili, **c** eritroblasto ortocromatico). Diff-Quik, elevato ingrandimento.



sa per l'elevata quantità di emoglobina e un nucleo estremamente condensato che determina un'ulteriore riduzione del rapporto N/C. La cellula successiva è l'eritroblasto ortocromatico tardivo (metarubrocita, normoblasto ortocromatico tardivo) nel quale il nucleo non è più vitale, intensamente nero o picnotico (Fig. 2). Il citoplasma può essere policromatico o non cromatico e cessa la sintesi di emoglobina. Questa cellula (9-11  $\mu\text{m}$  ca.) perde per estrusione il materiale nucleare dando origine al reticolocita che rappresenta l'ultima fase maturativa della serie rossa, permane nel midollo osseo per 24-48 ore<sup>7</sup>, e la sua maturazione finale avviene nel sangue periferico o a livello splenico. Il nome di questa cellula deriva dalla presenza di residui di materiale ribosomiale costituito quindi principalmente da acidi ribonucleici che conferiscono un aspetto reticolare evidenziabile in particolare con alcune colorazioni sopravitali (come quella con il nuovo blu di metilene utilizzato per la conta dei reticulociti circolanti). Infatti le colorazioni tipo Romanowsky, che prevedono un passaggio in metanolo, generalmente causano una dispersione di tale materiale reticolare non consentendone più l'evidenziazione. Con quest'ultimo tipo di colorazione le cellule assumono una colorazione più diffusamente azzurrognola rispetto agli eritrociti normali ed essendo anche le loro dimensioni maggiori rispetto a quest'ultimi ne permettono la differenziazione agli occhi di un esperto. L'eritrocita (5-8  $\mu\text{m}$  ca.) cellula anucleata, rappresenta l'ultimo stadio evolutivo di questa linea che dal midollo osseo passa nel circolo periferico. In questa cellula vengono persi definitivamente i residui ribosomiali e le capacità biosintetiche dell'emoglobina che, come visto in precedenza, caratterizza le ultime fasi evolutive del reticolocita.

## LA SERIE MIELO-MONOCITICA

In questa serie si distinguono essenzialmente due grossi gruppi cellulari che sono quelli che daranno origine ai differenti granulociti (neutrofili, eosinofili e basofili) e ai monociti circolanti. Entrambe queste famiglie cellulari deriva-

no dalla CFU-GM e sotto lo stimolo di differenti fattori di crescita e condizioni microambientali daranno origine all'una o all'altra popolazione cellulare. Sebbene la loro origine sia comune, le cellule mature presentano caratteri cellulari abbastanza ben distinguibili gli uni dagli altri e anche le loro funzioni sono differenti. Per questa serie cellulare è possibile identificare un pool cellulare proliferativo ed uno non proliferativo. Tali cellule sono dotate di granuli primari e granuli secondari contenenti varie molecole di natura proteica con differenti funzioni biologiche (Tab. 2). I granuli iniziano a comparire quando le cellule sono in fase replicativa.

La prima cellula della serie mieloide granulocitaria identificabile citomorfologicamente al microscopio ottico e derivante dalla CFU-GM è rappresentata dal mieloblasto dal quale origineranno da 16 a 32 metamielociti<sup>7</sup>. Il tempo di evoluzione da mieloblasto a granulocita neutrofilo maturo è di circa 4 giorni<sup>7</sup>. Le cellule in questo stadio sono già state commissionate a divenire granulocita neutrofilo, eosinofilo o basofilo, ma sono fra loro indistinguibili con le normali colorazioni tipo Romanowsky all'osservazione in microscopia ottica. Il mieloblasto si presenta come una grande cellula rotonda o irregolare. Il citoplasma è blu (basofilo) ma generalmente più chiaro che nel rubriblasto. Il citoplasma di un mieloblasto tipico (tipo I) non contiene granuli, ma nel mieloblasto tardivo (tipo II) (Fig. 4) possono essere presenti meno di 15 granuli azzurrofilici. Il nucleo rotondo presenta cromatina finemente distribuita e contiene 1 o più nucleoli o anelli nucleolari. La fase successiva è rappresentata dal promielocita (progranulocita) (Figg. 4, 5, 7A) che si presenta citomorfologicamente simile al precedente ma con citoplasma contenente granuli azzurrofilici. Il nucleo è leggermente più piccolo e con nucleoli non evidenziabili. Evolutivamente seguono quindi il mielocita (neutrofilo, eosinofilo, basofilo) (Figg. 2, 5, 7A) con nucleo più piccolo relativamente al volume cellulare (diminuito rapporto N/C) ed eccentrico ed iniziano a comparire i primi granuli citoplasmatici. In dettaglio il mielocita neutrofilico si presenta più piccolo del progranulocita con inizio della condensazione della cro-

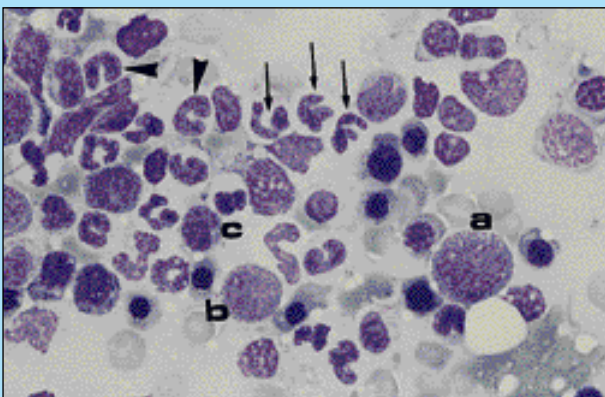


FIGURA 4 - Midollo osseo, cane: si osserva la prevalenza di elementi cellulari delle linee mieloide - **a** mieloblasto tardivo, **b** promielocita, **c** metamielocita neutrofilo, granulociti neutrofili a banda ( $\blacktriangleright$ ), granulociti neutrofili segmentati ( $\rightarrow$ ). Diff-Quik, elevato ingrandimento.

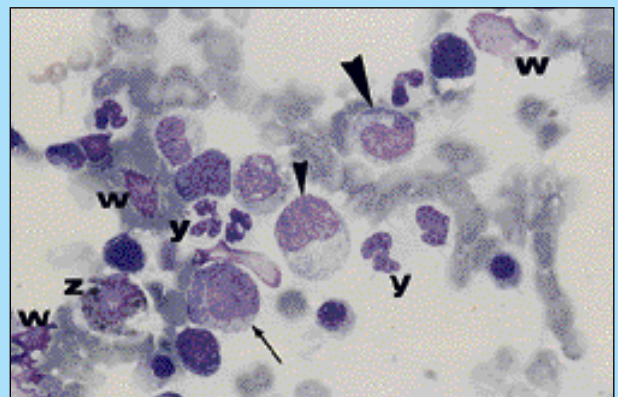


FIGURA 5 - Midollo osseo, cane. Si possono identificare i seguenti elementi mieloidi: promielocita ( $\rightarrow$ ), mielocita neutrofilo ( $\blacktriangleright$ ), un metamielocita neutrofilo ( $\blacktriangleright$ ), **y** granulociti neutrofili, **z** un macrofago contenente materiale intracitoplasmatico fagocitato, elementi della linea eritroide e con **w** alcuni elementi non identificabili. Diff-Quik, elevato ingrandimento.

**Tabella 2**  
**Differenti contenuti dei granuli e loro attività, riscontrabili nelle cellule della linea granulocitaria**

TIPO DI GRANULO	CONTENUTO
Granuli Primari o azzurofilili	Mieloperossidasi
	Lisozima
	Enzimi microbicidi
	Elastasi
	Catepsina G
	Proteasi neutre
	N acetil β-glucosaminidasi
	Catepsina B
	Catepsina D
	β-glicuronidasi
	idrolasi acide
Granuli secondari o specifici	<u>Granulociti Neutrofili</u>
	Lisozima
	Collagenasi
	Lattoferrina
	Transcobalamina
	<u>Granulociti eosinofili</u>
	Perossidasi eosinofila
	Fosfatasi acida
	Arilsulfatasi
	Enzimi lisosomiali
	Proteina eosinofila cationica
	Istaminasi
	Fosfolipasi D
	Proteina basica maggiore
	<u>Granulociti Basofili</u>
	Glucosaminoglicani
	Eparina
	Istamina
Particelle eterogenee	Presenti solo nei neutrofili
	Gelatinasi
	Idrolasi acide

matina nucleare, il citoplasma è blu chiaro e contiene da pochi a numerosi granuli specifici. Questi granuli, quando propriamente colorati, sono simili ad una polvere leggermente rosa. Il mielocita eosinofilo è generalmente di dimensioni maggiori del mielocita neutrofilo e il citoplasma, più basofilo, contiene granuli distinti di colore rosso-arancio. Il mielocita basofilo, nel cane e nel cavallo, non è una cellula comunemente osservabile nei preparati di midollo osseo e i suoi granuli citoplasmatici sono tipicamente metacromatici o rosso-porpora. Nel gatto, in questa cellula, i granuli possono essere essenzialmente di due tipi: 1) numerosi, piccoli e rosati; 2) più grandi, rotondi e neri. Al mielocita segue il metamielocita (Figg. 2, 5, 6A, 6B, 7A) che presenta un nucleo di iniziale aspetto reniforme e citoplasma più marcatamente granuloso. I metamielociti possono essere differenziati perché in questa fase evolutiva iniziano a comparire i granuli secondari o specifici di ciascuna linea granulocitaria. Infine segue il granulocita a banda (Figg. 2, 4, 7B) con nucleo a ferro di cavallo rapporto N/C ulteriormente diminuito e granuli citoplasmatici ben evidenziabili e differenti a seconda del tipo di granulocita (neutrofilo, eosinofilo, basofilo). La

forma di granulocita maturo (Figg. 2, 4, 5, 6B, 7B) presenta infine un citoplasma in proporzione più abbondante, ricco di granuli e nucleo di aspetto più condensato con lobi multipli che aumentano con l'età relativa della cellula. Il tempo necessario di sviluppo da mieloblasto a granulocita maturo è di circa 4 giorni. I granulociti permangono in circolo per un periodo relativamente breve di circa 10-14 ore, quindi lasciano il torrente circolatorio attraversando la parete vasale per diapedesi sotto l'effetto chemiotattico di differenti fattori (di origine batterica, fattori del complemento, proteine) raggiungendo i tessuti periferici ove permangono per alcuni giorni (2-3). Data la loro breve emivita, l'aumento o la diminuzione numerica si osserva facilmente esaminando il sangue periferico. In condizioni fisiologiche, il 90% dei granulociti totali è presente a livello midollare, mentre solo il rimanente 10% si riscontra in circolo e nei tessuti periferici.

Le funzioni principali di ciascun tipo cellulare granulocitario sono correlate alla dotazione di granuli intracitoplasmatici come indicato in Tabella 1 a cui si rimanda. L'attività fisiologica principale dei granulociti neutrofili è quella di fagocitare ed uccidere le specie batteriche nelle sedi di

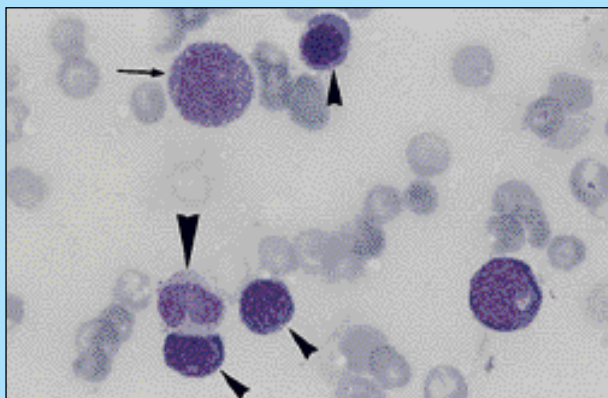


Figura 6A

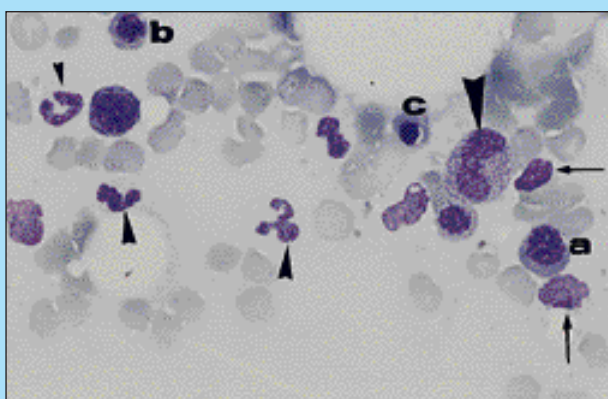


Figura 6B

**FIGURA 6** - Midollo osseo, cane: si possono osservare elementi della linea mieloide quanto di quella eritroide. **A**) metamielocita neutrofilo (➤), eritroblasti policromatici (➤), un eritroblasto basofilo in fase tardiva di evoluzione e un promielocita (→). **B**) Metamielocita eosinofilo (➤), granulocita neutrofilo a banda (➤), granulociti neutrofili segmentati maturi (➤), **a** eritroblasto policromatico, **b** eritroblasto ortocromatico, **c** eritroblasto ortocromatico tardivo ed elementi non classificabili (→). Diff-Quik, elevato ingrandimento.

infezione, utilizzando differenti sistemi e composti attivi quali il complesso mieloperossidasi, l'anione superossido, il radicale idrossile ed enzimi lisosomiali.

I granulociti eosinofili hanno un'emivita di circa 30 minuti nel sangue periferico per poi passare nei tessuti ove possono permanere per circa 12 giorni. Queste cellule sono coinvolte nelle patologie su base allergica, nei processi difensivi contro i parassiti e nella gran parte dei processi infiammatori. Nel primo caso queste cellule svolgono un ruolo regolatorio fagocitando gli immunocomplessi, inibendo la degranulazione dei mastociti, inattivando l'istamina libera ed altre amine liberate dai mastociti. Nelle patologie parassitarie i granulociti eosinofili sono in grado di distruggere gli organismi infestanti producendo proteine cationiche, metaboliti dell'ossigeno, enzimi idrolitici lisosomiali e lisofosfolipasi.

Infine i granulociti basofili (Fig. 8), che numericamente sono i meno rappresentati, sono i mediatori cellulari principali coinvolti nelle reazioni di ipersensibilità immediata liberando mediatori vasoattivi contenuti all'interno dei loro granuli citoplasmatici metacromatici. L'iniziale degranulazione è alla base dell'inizio delle reazioni infiammatorie acute, mentre la loro lenta degranulazione contribuisce

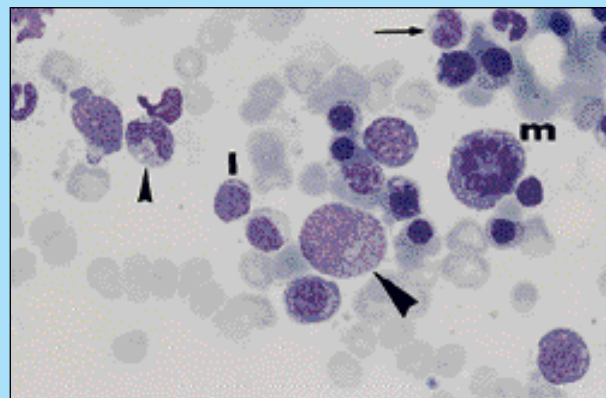


Figura 7A

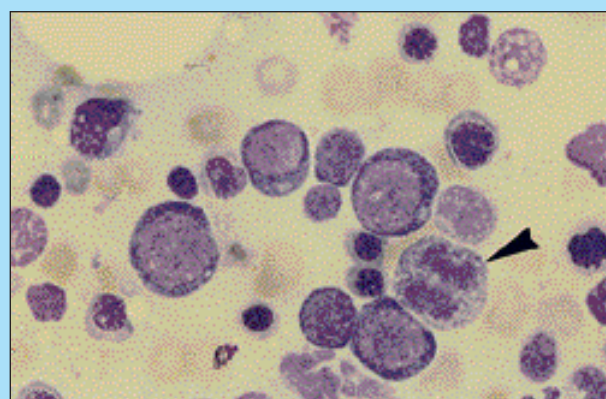


Figura 7B

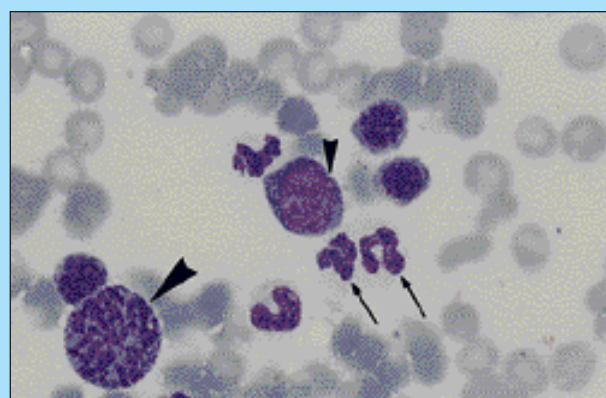


Figura 7C

**FIGURA 7** - Nei preparati citologici di midollo osseo è possibile osservare anche la presenza di cellule in differenti stadi mitotici. **A**) Si osserva la presenza di **m** una cellula in mitosi, un promielocita (➤), un metamielocita (➤), un mielocita neutrofilo (→), indicato con **l** un piccolo linfocita ed elementi multipli della serie eritroide a differenti stadi evolutivi. **B**) Si osserva una cellula in mitosi (➤) ed elementi cellulari prevalentemente della serie eritroide. **C**) Una cellula in mitosi (➤), un eritroblasto basofilo (➤), un granulocita a banda (➤), due granulociti neutrofili segmentati maturi (→) ed elementi della linea eritroide. Diff-Quik, elevato ingrandimento.

alla fase ritardata. I granulociti basofili e i mastociti tessutali partecipano anche al sistema della coagulazione e della fibrinolisi.

Alla serie mielo-monocitica oltre ai granulociti appartengono anche i monociti. Questi ultimi presentano un nucleo che occupa circa la metà della cellula e derivano come i granulociti da una cellula progenitrice chiamata CFU-



GM che si differenzia nel primo rappresentante di questa serie chiamato monoblasto. Citomorfologicamente questa cellula assomiglia al mieloblasto dal quale è difficile differenziarla con le comuni colorazioni e all'osservazione in microscopia ottica. Il nucleo appare leggermente più convoluto e con una lieve indentatura. A questa cellula segue il promonocita nel quale i nucleoli non sono evidenziabili e il nucleo inizia ad assumere una forma più allungata e indentata. In questa fase il citoplasma inizia ad essere più ampio ed occasionalmente possono essere evidenziati alcuni vacuoli. Nel monocita maturo il citoplasma appare più chiaro, debolmente basofilo alle colorazioni tipo Romanowsky e il nucleo si presenta più largo, di aspetto ameboide e può assumere forme non regolari. Il tempo di permanenza a livello midollare è di circa 3 - 4 giorni per poi entrare nel circolo ematico periferico.

Dal punto di vista funzionale i monociti svolgono attività di fagocitosi, attività microbicide, attività citotossiche, fagocitano e degradano residui cellulari. Questa serie cellulare è coinvolta anche in molte fasi della risposta immunitaria in associazione con le cellule della serie linfoide (azione stimolatoria, come cellule presentanti l'antigene). Le loro funzioni sono in parte dovute alla produzione e liberazione di una molteplicità di sostanze biologicamente attive come prodotti con attività antimicrobica e citotossica, proteine lisosomiali, interleuchine, fattori di crescita per altre linee cellulari (CSF's) sostanze ad attività procoagulante e fibrinolitica, proteine con attività chelante, etc.

I monociti permangono nel circolo periferico per 1-3 giorni e raggiungono poi i distretti periferici tissutali ove prendono il nome di macrofagi tissutali e ove permangono per periodi più o meno lunghi, anche di mesi.

## LA SERIE LINFOIDE

Le cellule della serie linfoide sono presenti nel midollo osseo e in tutti i tessuti linfoidei che sono rappresentati dalla milza, i linfonodi, il timo e le strutture linfoidei tessuto-associate BALT e GALT. Nel midollo vengono prodotti linfociti sia della linea T che B, ma in particolare quelli appartenenti a quest'ultima linea. In genere comunque non sono ivi particolarmente rappresentati essendo soprattutto

presenti in altri distretti organici e tissutali (milza, linfonodi, timo, BALT, GALT, etc.). Il timo produce molecole in grado di stimolare lo sviluppo di pre-linfociti T in linfociti T. La gran parte dei linfociti circolanti nel sangue periferico sono però rappresentati da cellule memoria.

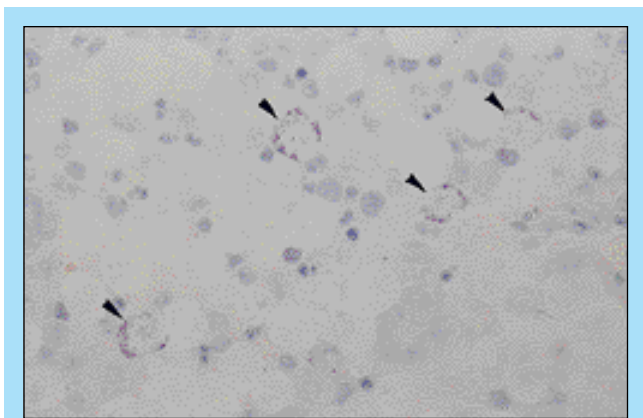
Dopo stimolazione antigenica, i linfociti B si trasformano in plasmacellule (osservabili anche a livello midollare) che sono in grado di produrre e liberare anticorpi. I linfociti T svolgono invece attività stimolatorie o inibitorie, per se stesse o per altre linee cellulari, o azioni citocidiche e possono in relazione alle loro funzioni e alla loro tipizzazione essere differenziati in linfociti  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ , Suppressor, T citotossici. Esiste poi un altro sottotipo di cellula linfoide definita non-T non-B e identificabile come cellula Natural Killer o LGL (Large Granular Lymphocyte, Linfocita a Grandi Granuli). Queste sub classi di linfociti esprimono sulla superficie cellulare specifiche proteine che possono essere utilizzate come marcatori identificativi che consentono quindi di suddividere le differenti sottoclassi linfocitarie.

Dal punto di vista citomorfologico, i linfociti appaiono eterogenei sia per le dimensioni che per la morfologia, ma generalmente sono più piccoli dei granulociti neutrofili, hanno un nucleo più densamente colorato ed una scarsa quantità di citoplasma. I piccoli linfociti (Fig. 7A) presentano un nucleo rotondo di aspetto denso e spesso eccentrico e nel gatto può apparire quasi reniforme<sup>2</sup>. Il citoplasma è estremamente scarso e basofilo. I grossi linfociti, rispetto ai precedenti, presentano un nucleo di aspetto meno denso, più pallido, e di forma rotondeggiante. In questi linfociti il citoplasma appare più abbondante e meno intensamente basofilo. Le plasmacellule si presentano invece con nucleo rotondo, eccentrico, con cromatina compatta. Il citoplasma è molto abbondante con un'area più chiara in prossimità di un polo del nucleo corrispondente all'apparato del Golgi. Alcune plasmacellule possono presentare all'interno del citoplasma i corpi di Russell e in tal caso vengono comunemente denominate cellule di Mott.

Nei preparati di midollo osseo di cane e gatto in condizioni fisiologiche possiamo osservare rispettivamente nelle due specie meno del 15% e 20% di linfociti e meno del 2% di plasmacellule<sup>6</sup>.

## LA SERIE MEGACARIOCITICA

Dalla cellula progenitrice di base identificata come CFU-M deriva inizialmente il megacarioblasto (Fig. 9A), che si osserva raramente in uno striscio midollare perché presente in bassa percentuale; le sue dimensioni sono circa il doppio rispetto al mieloblasto della linea mieloide. Il citoplasma appare in scarsa quantità, chiaro e di colore blu. Possono inoltre essere spesso osservate piccole estroflessioni sulla superficie citoplasmatica. Il nucleo, più denso degli altri blasti, si presenta da ovale ad irregolare, con nucleoli multipli (da uno a quattro). Dal megacarioblasto origina il promegacariocita, di dimensioni superiori al precedente, citoplasma abbondante e marcatamente basofilo. Il numero dei nuclei può essere di otto o più o si può osservare un nucleo lobulato nel quale possono osservarsi residui nucleolari. Infine, segue il megacariocita (Figg. 9B, 9C), delle dimensioni variabili fra i 50 e i 200  $\mu m$ , è una cellula con nuclei multipli perché in questa cellula avven-



**FIGURA 8** - Si osservano alcune cellule appartenenti alla linea granulocitaria basofila con i tipici granuli metacromatici che possono essere ben evidenziabili con la colorazione al blu di toluidina. Blu di Toluidina, medio ingrandimento.



gono mitosi successive ma senza divisione cellulare (processo chiamato di endomitosi), e ciò comporta conseguentemente un aumento anche del volume citoplasmatico. Il citoplasma debolmente eosinofilo contiene numerosi granuli che si presentano di maggiori dimensioni all'interno di una sorta di pseudopodi cellulari la rottura dei quali dà origine alle piastrine. Il tempo necessario di evoluzione da megacariocita a piastrine è di circa 4-5 giorni, che in con-

dizioni fisiologiche permangono in circolo per un periodo variabile di circa 10-12 giorni. Come risaputo questa linea cellulare è coinvolta in particolare nei fenomeni correlati all'emostasi che è articolata in più fasi quali quella vascolare, piastrinica e plasmatica.

## LE INDAGINI CITOCHEMICHE

La citochimica in ematologia ha il compito di facilitare l'identificazione di elementi normali, patologici o di evidenziare componenti cellulari anomale, non riconoscibili con l'impiego delle comuni colorazioni. Questo tipo di indagine si diversifica dalle colorazioni standard sia per quanto riguarda la fissazione che per quanto riguarda i sistemi di rilevazione che ovviamente sono specifici per ciascuna caratteristica enzimatica che si vuole evidenziare o per rilevare la presenza di determinati substrati<sup>8,9,10,11,12,13</sup>. La presenza/assenza di una positività ad una reazione citochimica rispetto ad un'altra (Figg. 10A - 10D), consente di facilitare la classificazione della cellula in una linea cellulare rispetto ad un'altra. Alcune indagini citochimiche consentono anche di valutare le riserve funzionali del midollo osseo, come ad esempio la determinazione delle riserve di ferro intramidollari. Al fine di rendere più facilmente interpretabili e correlabili i differenti risultati ottenibili con tale tipo di metodica, i criteri valutativi sono stati riportati sinteticamente in Tabella 3.

## CRITERI VALUTATIVI

Il corretto approccio della valutazione del midollo osseo prevede un contemporaneo prelievo ematico per l'esecuzione di un esame emocromocitometrico completo comprensivo della conta reticolocitaria, un aspirato midollare per l'allestimento di preparati citologici e, se necessario, l'esecuzione di una biopsia midollare di tipo istologico. Ciascuno di tali differenti esami consente di ottenere una valutazione globale della sfera ematopoietica, in quanto: a) l'esame emocromocitometrico fornisce informazioni quantitative relative ed assolute sulle popolazioni cellulari circolanti nonché una valutazione morfologica delle stesse<sup>14</sup>; b) l'aspirato midollare consente: 1) di valutare in maniera ottimale la citomorfologia delle popolazioni cellulari ematopoietiche<sup>14</sup> eventualmente arricchita dall'esecuzione di tecniche citochimiche; 2) una valutazione semiquantitativa delle differenti popolazioni cellulari presenti a livello di midollo osseo in quanto non avendo a disposizione una conta totale (come per l'esame emocromocitometrico) non è possibile eseguire calcoli in termini di conta assoluta, ma solo percentuale e quindi relativa; 3) determinare i rapporti tra le differenti popolazioni cellulari determinando alcuni indici<sup>14</sup>; c) la biopsia midollare che permette: 1) di valutare se l'eventuale citopenia osservabile all'aspirato midollare sia reale o solo secondaria ad errori di prelievo; 2) di eseguire una più corretta valutazione delle riserve di ferro in un volume definito di midollo osseo; 3) ottenere informazioni relative all'architettura tessutale; 4) identificare con maggior sicurezza diagnostica condizioni in cui i preparati citologici di aspirati midollari siano scarsamente cellulari perché il tessuto midollare si presenta poco cellulare

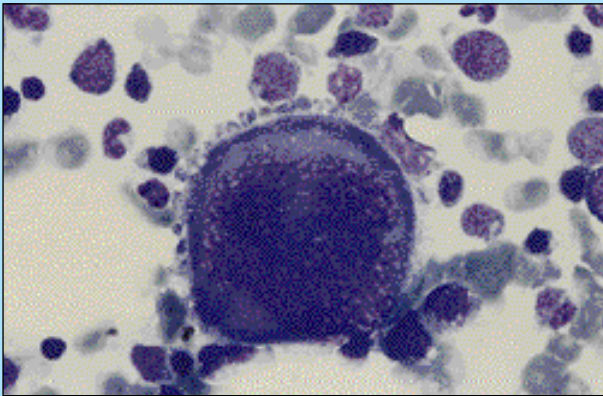


Figura 9A

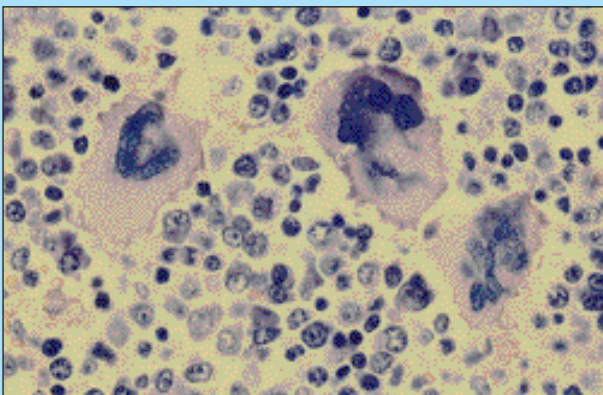


Figura 9B

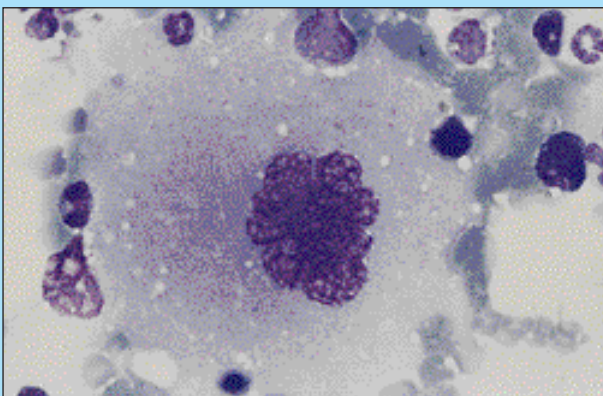


Figura 9C

**FIGURA 9 - Elementi cellulari della linea megacariocitica. A)** Midollo osseo, cane: un megacarioblasto del quale possono essere apprezzate le tipiche estroflessioni sulla superficie della membrana cellulare. Diff-Quik; elevato ingrandimento. **B)** Midollo osseo, gatto: tre megacariociti: è possibile osservare il tipico aspetto multilobulato dei nuclei e l'abbondante citoplasma. Istologico, Giemsa, elevato ingrandimento. **C)** Midollo osseo, cane: un megacariocita di cui si può notare in particolare l'apparente multilobulatura del nucleo e l'aspetto granuloso del citoplasma. Diff-Quik, elevato ingrandimento.

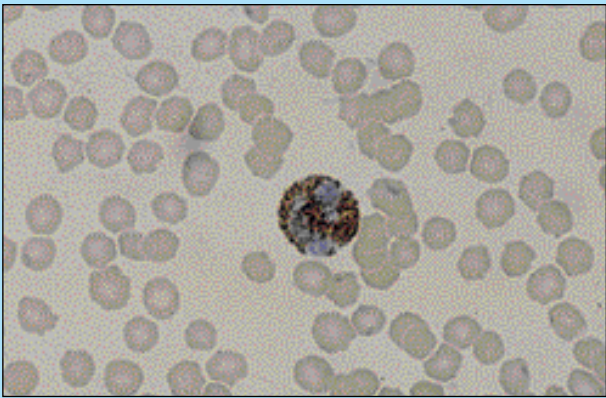


Figura 10A

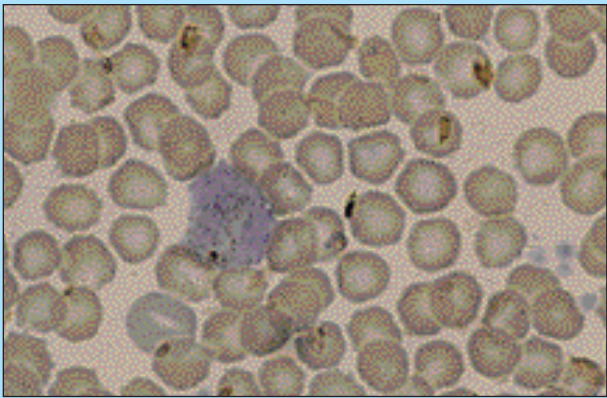


Figura 10B

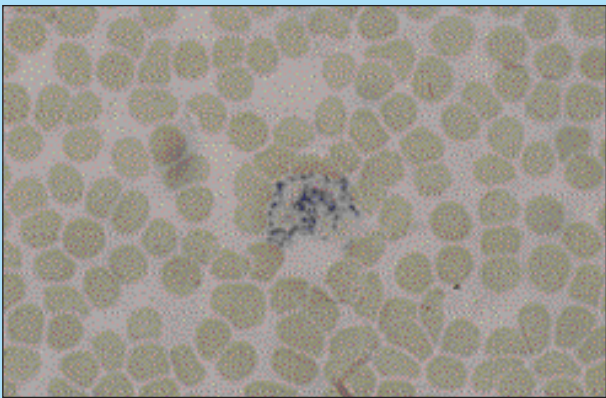


Figura 10C

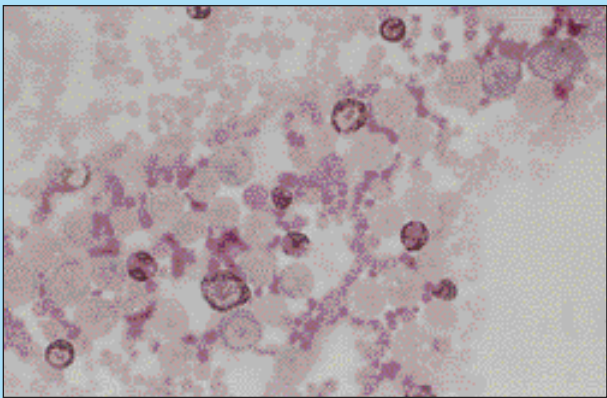


Figura 10D

FIGURA 10 - Reazioni citochimiche - **A)** Perossidasi: reazione positiva (granuli giallo-bruno scuro intracitoplasmatici) in un granulocita neutrofilo maturo (Benzidina-Giemsa, elevato ingrandimento). **B)** Perossidasi: debole reazione in un monocita (Benzidina-Giemsa, elevato ingrandimento). **C)** Reazione positiva per la cloracetato esterasi in granulociti neutrofili che presentano granuli blu intracitoplasmatici (Fast Blue BB-Kernecthrot, elevato ingrandimento). **D)** Sudan Black B: cellule della linea neutrofila e monocitaria con marcata positività citoplasmatica bruno-nerastra (Sudan Black B-Safranina, medio ingrandimento).

Tabella 3  
Positività dei principali marker citochimici leucocitari

LINEA CELLULARE	PEROSSIDASI	CAE	NSE	FOSFATASI ACIDA	SUDAN BLACK B	PAS
<b>SPECIE CANINA</b>						
Neutrofila	+++	+++	–	±	++	++
Eosinofila	+++	–	–	+	–	–
Basofila	–	–	–	+	–	–
Monocitaria	– / ±	–	++ / +++	+	+++	++
Linfocitaria	–	–	– / ±	– / + F	–	–
<b>SPECIE FELINA</b>						
Neutrofila	+++	++	–	±	+++	++
Eosinofila	+++	–	–	+++	–	–
Basofila	–	++	–	±	–	–
Monocitaria	–	–	++	±	+++	++
Linfocitaria	–	–	– / + F	– / + F	–	–

Legenda:  
CAE = clor-acetato esterasi - NSE = naftil-acetato esterasi - PAS = acido periodico di Schiff - F = positività focale  
– = negativo - ± = debole positività - + = positività moderata - ++ = positività moderatamente forte - +++ = cellule fortemente positive



come ad esempio nella mielofibrosi<sup>14</sup>. La biopsia midollare è quindi indicata in caso di: 1) anomalie a carico di più linee cellulari; 2) in corso di anemie non-rigenerative con diminuzione dei precursori eritroidi; 3) anemie rigenerative con eccessivo incremento di progenitori eritroidi; 4) infiltrati di cellule neoplastiche a carico del midollo osseo; 5) fagocitosi di precursori eritroidi che possono indicare disordini immunitari; 6) incrementato numero di plasmacellule come ad esempio nell'ehrlichiosi<sup>15</sup>.

L'esame dello striscio midollare comporta essenzialmente due differenti tipi di valutazione che sono una di tipo quantitativo e l'altra di tipo qualitativo, dando per scontato il fatto di avere a disposizione materiale esaminabile di buona/ottima qualità e di adeguata cellularità. La prima consente di determinare il giusto equilibrio e quindi i giusti rapporti numerici tra una linea cellulare e l'altra, o di evidenziarne alterazioni quantitative e percentuali. Tali considerazioni sono possibili previa una conta differenziale fra le differenti popolazioni cellulari scegliendo campi microscopici di buona cellularità e che siano rappresentativi della condizione reale del midollo osseo in esame. Il conteggio prevede di contare un numero relativamente alto di cellule (500 cellule) al fine di ottenere una valutazione realistica<sup>16</sup>.

La cellularità del campione deve essere valutata in associazione con i frammenti di midollo osseo (agglomerati di midollo osseo solido) che si vengono a distribuire in tutto il vetrino e in rapporto proporzionale con il tessuto adiposo ad essi frammisto (proporzione tra componente adiposa e cellule ematopoietiche). Ciò è possibile esaminando tutto il vetrino e, se possibile, più vetrini allestiti dal medesimo campione o eventualmente da più campioni che siano rappresentativi.

Dal punto di vista pratico la conta cellulare differenziale può essere quindi eseguita contando le differenti cellule appartenenti a diverse linee cellulari e accorparle in un'unica tabella ed eseguire i conteggi percentuali e quindi il rapporto mieloide/eritroide. È buona norma prendere in considerazione anche le cellule non appartenenti alla linea bianca e rossa, quali ad esempio cellule nelle differenti fasi mitotiche, gli osteoclasti (Fig. 11), gli osteoblasti, cellule endoteliali, ematogoni (nuclei liberi, rotondi e picnotici derivanti dalla rottura dei metarubrociti) cellule neoplastiche ed elementi non identificabili (Figg. 2, 5, 6). In linea del tutto schematica si ritiene che la scheda illustrata in Tabella 4 possa essere un'utile guida da utilizzare nella pratica quotidiana.

L'esame citologico consente inoltre di poter esaminare altri importanti parametri come le fasi di maturazione cellulari, l'EMI o Erythroid Maturation Index o Indice di Maturazione Eritroide, l'MMI o Myeloid Maturation Index o Indice di Maturazione Mieloide e il rapporto mieloide/eritroide (M:E).

Il rapporto **Mieloide/Eritroide** rappresenta il rapporto fra le due principali linee cellulari del midollo osseo e consente un'iniziale valutazione dello stato del midollo osseo. Il range normale è di 1:1 (più precisamente da 0,75 a 2,75) nella specie canina e di 2:1 (da 1 a 3) nella specie felina<sup>17</sup>. In linea generale si considera che tale rapporto sia alterato quando è almeno tre volte superiore rispetto ai valori normali<sup>18</sup>. Questo rapporto aumenta ad esempio nelle infezioni batteriche, nelle aplasie eritroidi, nelle leucemie mieloidi, mentre diminuisce nelle iperplasie eritroidi, nell'eritroleucemie e negli stati di agranulocitosi. La misura viene

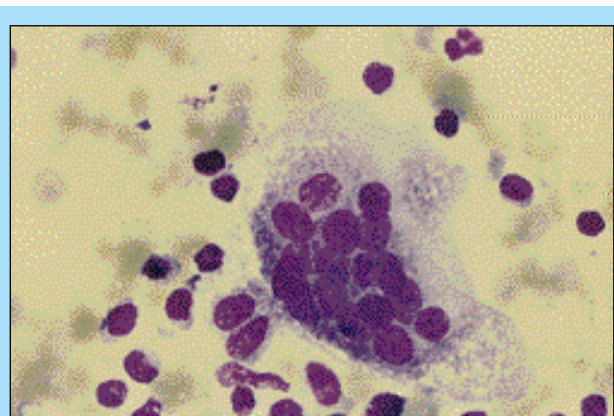


FIGURA 11 - Midollo osseo, cane: si osservi il tipico aspetto citomorfologico di un osteoclasta che si presenta come una cellula gigante multinucleata in cui, a differenza di quanto si osserva nei megacariociti, i nuclei risultano distinguibili fra loro. Il citoplasma appare basofilo e vacuolizzato. Diff-Quick, elevato ingrandimento.

eseguita rapportando le cellule della linea mieloide granulocitica comprensiva dei granulociti maturi alle cellule nucleate della linea eritroide.

L'EMI è alterato quando è inferiore a 3 e viene determinato dalla seguente formula:

$$\text{EMI} = \frac{\text{cellule eritroidi in maturazione}}{\text{cellule eritroidi in proliferazione}}$$

in cui le cellule eritroidi in maturazione sono rappresentate dal proeritroblasto e dall'eritroblasto basofilo, mentre le cellule eritroidi in maturazione sono l'eritroblasto policromatofilo e l'ortocromatico. In funzione di questo indice si potrà dire se la linea eritroide è in fase maturativa o proliferante<sup>18</sup>.

L'MMI è alterato quando inferiore a 8 e viene calcolato con il seguente rapporto:

$$\text{MMI} = \frac{\text{cellule mieloidi in fase di maturazione}}{\text{cellule mieloidi in fase di proliferazione}}$$

in questo caso le cellule in fase di maturazione sono rappresentate dai metamielociti e dai granulociti a banda, mentre le cellule mieloidi proliferanti sono i mieloblasti, i promielociti e dai mielociti. Anche in questo caso è possibile definire se la linea mieloide si trova in una fase proliferativa o maturativa<sup>18</sup>.

Un'ulteriore aspetto che possiamo considerare è il valore percentuale medio dei differenti rappresentanti cellulari (Tab. 5). Secondo alcuni autori la popolazione cellulare nel midollo osseo può essere rappresentata fino al 15% da linfociti e fino al 2% da plasmacellule<sup>17</sup>, mentre generalmente i monociti, i macrofagi e le cellule in mitosi non eccedono 1-2% delle cellule nucleate totali. Gli osteoclasti e gli osteoblasti possono essere occasionalmente osservati in uno striscio di midollo osseo normale. Al termine della valutazione delle informazioni ottenute l'esame del midollo osseo consente di ottenere determinate conclusioni indicate in Tabella 6.

Infine la valutazione dell'esame citologico e dei valori che esso può fornire deve ovviamente essere inquadrato nell'ambito dei dati anamnestici, dei segni clinici, dell'esame emocromocitometrico completo e delle eventuali ulteriori indagini diagnostiche eseguite al fine di ottenere un'adeguata valutazione complessiva di ciascun caso clinico.

## CONCLUSIONI

Il midollo osseo può essere esaminato con successo mediante la valutazione citologica di un aspirato midollare. L'esame citologico del midollo osseo viene indicato in molteplici condizioni patologiche come le citopenie delle differenti linee cellulari, leucocitosi, policitemia, trombocitosi, aumento di cellule immature circolanti nel sangue periferico, patologie mieloproliferative, metastasi (mastocitoma, plasmocitoma, altre neoplasie) lesioni ossee multifocali, ricercare o confermare un'eventuale malattia occulta con febbre di origine sconosciuta, nei casi di ipergammaglobulinemia, stadiazione del linfoma multicentrico, stimare l'adeguatezza delle riserve di ferro. È però evidente che per ottenere una corretta valutazione citologica nelle condizioni patologiche è richiesta la conoscenza delle normali caratteristiche citomorfologiche delle differenti linee cellulari. A questo scopo differenti metodiche specialistiche, come la citochimica e l'immunocitochimica, possono essere di aiuto nell'identificazione delle differenti linee cellulari sia nelle condizioni fisiologiche che patologiche.

## Ringraziamenti

*Si ringraziano per la cortese e preziosa collaborazione i Sig.ri Emanuele Zanetti, Enrico Gallo e la Dr.ssa Miriam Isatto.*

## Abbreviazioni & simboli

PSC	Pluripotential Stem Cell	cellula staminale pluripotente
CFU	Colony Forming Unit	unità formanti colonia
BFU-E	Burst Forming Unit-Erythroid	unità formanti macrocolonie - eritroidi
CFU-E	Colony Forming Unit-Erythroid	unità formanti colonia-eritroidi
CFU-GM	Colony Forming Unit-Granulocyte/Monocyte	unità formanti colonia granulociti-monociti
CFU-M	Colony Forming Unit-Monocyte	unità formanti colonia-monociti
CFU-Meg	Colony Forming Unit-Megakaryocyte	unità formanti colonia-megacariociti
Th1	T helper 1	linfociti T helper 1
Th2	T helper 2	linfociti T helper 2
LGL	Large Granular Lymphocyte	grossi linfociti granulari
BALT	Bronchus-Associated Lymphoid Tissue	tessuto linfoide bronco-associato
GALT	Gastrointestinal-Associated Lymphoid Tissue	tessuto linfoide gastrointestinale-associato
N/C	Nucleus/Cytoplasm ratio	rapporto nucleo/citoplasma
CSF	Colony Stimulating Factor	Fattore Stimolante Colonie

**Tabella 4**  
**Scheda di valutazione di un esame citologico di midollo osseo**

TIPO CELLULARE	N° TOTALE CELLULE	%
<b>Serie Eritroide</b>		
Proeritroblasto		
Eritroblasto basofilo		
Eritroblasto policromatofilo		
Eritroblasto ortocromatico		
Totale cellule linea eritroide		
<b>Serie Mieloide</b>		
Mieloblasto		
Promielocita		
Mielocita neutrofilo		
Mielocita eosinofilo		
Metamielocita neutrofilo		
Metamielocita eosinofilo		
Granulocita neutrofilo a banda		
Granulocita eosinofilo a banda		
Granulocita neutrofilo segmentato		
Granulocita eosinofilo segmentato		
Granulocita basofilo		
Totale cellule linea mieloide		
Linfociti		
Plasmacellule		
Monociti		
Macrofagi		
<b>Altre cellule</b>		
Megacariociti		
Mastociti		
Osteoblasti		
Osteoclasti		
Mitosi		
Cellule non identificate		
<b>RAPPORTO MIELOIDE/ERITROIDE</b>		
EMI		
MMI		
<b>CELLULARITÀ</b>		
<b>DEPOSITI DI EMOSIDERINA</b>		
<b>COLORAZIONI SPECIALI</b>		
<b>IMMUNOCITOCHIMICA</b>		
<b>ANNOTAZIONI</b>		
<b>COMMENTO DIAGNOSTICO</b>		



**Tabella 5**  
**Conta differenziale percentuale indicativa delle popolazioni cellulari ematopoietiche del midollo osseo nel cane e nel gatto**  
**(A) Jain, 1993 - modificato; B) Harvey, 1984 - modificato)**

TIPO CELLULARE	SPECIE CANINA (A)	SPECIE CANINA (B)	SPECIE FELINA (A)
<b>Serie Eritroide</b>	%	%	%
Proeritroblasto	0,20	6,50	0,17
Eritroblasto basofilo	3,90		1,00
Eritroblasto policromatofilo	27,00	27,60	4,02
Eritroblasto ortocromatico	15,30		17,57
Totale cellule linea eritroide	<b>46,40</b>	<b>34,10</b>	<b>28,74</b>
<b>Serie Mieloide</b>			
Mieloblasto	0,00	0,90	0,08
Promielocita	1,30	2,10	1,74
Mielocita neutrofilo	9,00	6,30	4,31
Mielocita eosinofilo	0,00	0,60	0,60
Metamielocita neutrofilo	7,50	///	10,06
Metamielocita eosinofilo	2,40	0,70	0,54
Granulocita neutrofilo a banda	13,60	11,30	14,40
Granulocita eosinofilo a banda	0,90	1,20	0,49
Granulocita neutrofilo segmentato	18,40	23,50	12,86
Granulocita eosinofilo segmentato	0,30	0,80	0,60
Granulocita basofilo	0,00	0,02	0,00
Totale cellule linea mieloide	<b>53,40</b>	<b>55,20</b>	<b>46,40</b>
RAPPORTO MIELOIDE/ERITROIDE	1,15:1,00	1,70:1,00	1,63 ÷ 0,35:1
Linfociti	0,20	8,20	16,31
Plasmacellule	///	0,70	0,80
Monociti	0,00	0,00	0,71
Macrofagi	///	0,40	0,06
<b>Altre cellule</b>			
Megacariociti	///	///	///
Osteoblasti	///	///	///
Osteoclasti	///	///	///
Mitosi	///	1,40	0,20
Cellule non identificate	///	///	///

**Tabella 6**  
**Conclusioni ottenibili dall'esame del midollo osseo relativamente alle linee cellulari ematopietiche (Tvedeten 1989, modificato)**

DIAGNOSI	DEFINIZIONE
Iperplasia eritroide	Aumentata proliferazione di cellule eritroidi (precursori dei globuli rossi)
Ipoplasia eritroide	Diminuita proliferazione di cellule eritroidi
Iperplasia mieloide	Aumentata proliferazione di cellule mieloidi/monocitarie (neutrofili, eosinofili, basofili, monociti)
Ipoplasia mieloide	Diminuita proliferazione di cellule della linea mieloide
Iperplasia megacariocitica	Aumentata proliferazione di cellule della linea megacariocitaria
Pancitopenia aplastica	Assenza di cellule di tutte le linee ematopoietiche
Iperplasia linfoide	Aumentata proliferazione di linfociti e plasmacellule

GM-CSF	Colony Stimulating Factor-Granulocyte monocyte	Fattore Stimolante Colonie-Granulociti monociti	IL	interleukine	l'ematopiesi
M-CSF	Colony Stimulating Factor-Monocyte	Fattore Stimolante Colonie-Monociti	PGE	prostaglandin E	Interleuchina
Meg-CSF	Colony Stimulating Factor-Megakaryocyte	Fattore Stimolante Colonie-Megacariociti	PGI	prostaglandin I	prostaglandina E
HIM	Hematopoietic Inductive Microenvironment	Microambiente inducente	TNF	Tumor Necrosis Factor	prostaglandina I o prostaciclina
			FeLV	Feline Leukemia Virus	fattore di necrosi tumorale
					virus della leucemia felina

PAS	Periodic Acid Schiff	Acido Periodico di Schiff
CAE	Chloracetate Esterase	Cloracetato Esterasi
NSE	Naphtyl Acetato Esterase	Naftil Acetato Esterasi

## Parole chiave

*Midollo osseo, fisiologia, emopoiesi, citomorfologia, citochimica, cane, gatto.*

## Key words

*Bone marrow, physiology, haemopoiesis, cytomorphology, cytochemistry, dog, cat.*

## Bibliografia

1. Jain C.N.: Examination of the blood and bone marrow. In: Essentials of Veterinary Hematology, Ed. by Jain CN, Philadelphia, Lea & Febiger, 1993, pp 1-18.
2. Bacha WJ Jr, Wood LM: Bone marrow. In Color atlas of veterinary histology, Ed. by Bacha WJ Jr, Wood LM, Lea & Febiger, Philadelphia, 1990, pp 37-40.
3. Haschek WM, Rosseaux CG: Blood and bone marrow. In: Fundamentals of toxicologic pathology. Ed. by Haschek WM, Rosseaux CG, San Diego, Academic Press, 1998, pp 215-232.
4. Nathan D.G., Sytkowski A.: Erythropoietin and regulation of erythropoiesis. N. Engl. J. Med. 308:520-522, 1983.
5. Brown G: Toxicological haematology. Notes to accompany a lecture given to British Society of Toxicological Pathologists, 13-07-98, Cambridge, 1998, pp. 1-29.
6. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH: 23. Bone Marrow. In: Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat. Ed by Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH. St Louis, Mosby Inc., 1999, pp 284-304.
7. Villiers E, Dunn JK: Basic Haematology. In: Manual of small animal clinical pathology. Ed. by Davidson M, Else R, Lumsden J, BSAVA, Shur-dington, 1998, pp. 33-60.
8. Catovsky D, Galetto J, Okos A et al: Cytochemical profile of B and T leukemic lymphocytes with special reference to acute lymphoblastic leukemia. J Clin Pathol 27: 767-771, 1974.
9. Kaplow LS, Burstone MS: Cytochemical demonstration of acid phosphatase in hematopoietic cells in health and in various hematological disorders using azodye technique. J Histochem Cytochem 12:805, 1964.
10. Kaplow LS: Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. Blood 26:215-219, 1965.
11. Moloney WC, Fliegelman L, McPhearson K: The use of naphthyl AS-D chloroacetate as a substrate for the study of leukocyte esterase activity. J Histochem Cytochem 7:306-307, 1959.
12. Fournel-Fleury C, Magnol JP, Guel JF: Hematopoietic bone marrow. In: Color atlas of cancer Cytology of the dog and cat. Ed by Fournel-Fleury C, Magnol JP, Guel JF, Paris, CSPVA, 1994, pp. 351-423.
13. Raskin E, Valenciano A: 51. Cytochemistry of normal leukocytes. In: Schalm's Veterinary Hematology fifth edition. Ed by Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp. 337-346.
14. Tvedeten H.: The complete blood count and bone marrow examination. General comments and selected techniques. In: Willard MD, Tvedeten H, Turnwald GH: Small animal clinical diagnosis. Saunders Company, Philadelphia, 1989, pp 14-35.
15. Straus JH: Anemia. In: Quick reference to veterinary medicine. Ed. by Fenner WR, Lippincott Company, Philadelphia, 1991, pp 481-496.
16. Harvey J.W.: Canine bone marrow: normal hematopoiesis, biopsy techniques, and cell identification and evaluation. In: The Compendium Collection. Veterinary laboratory medicine. In practice. Veterinary Learning Systems, Trenton, 1993, pp 208-225.
17. Meyer D.J., Harvey J. W.: Hematopoiesis and evaluation of bone marrow. In: Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and diagnosis, W.B. Saunders, Philadelphia, 1998, pp 23-42.
18. Sodikoff C.H.: Studio del midollo osseo emopoietico. In: Medicina di laboratorio del cane e del gatto. Guida pratica alle diagnosi di laboratorio. Edizione italiana e traduzione della seconda edizione americana a cura di Marco Caldin, Tommaso Furlanello. Masson - Edizioni Veterinarie, Milano, 1997, pp 101-106.

# il trattamento delle dermatomicosi

## Soluzione antimicotica

Indicato per il trattamento ed il controllo delle dermatomicosi.

marchio registrato

**Disponibile in farmacia**

confezione da 100 ml



**JANSSEN-CILAG SpA**  
20133 Milano - Via Michelangelo Buonarroti, 23 - Tel. 02/25101 - Fax 02/26708196

**Milano**

Via Michelangelo Buonarroti, 23 • 20093 Cologno Monzese • Tel. 0225101 - Fax 0226708196