

***Corso di aggiornamento annuale per operatori
dei Registri Tumori***

11 settembre 2013

I MARKER TUMORALI NELLE LEUCEMIE, LINFOMI E MIELOMI

Adriano Giacomin, Stefano Luminari



1.a PREMESSA GENERALE

MARKERS UTILI

INDICATORI **NON AMBIGUI** UTILIZZATI PER

-FINI DIAGNOSTICI

-FINI CLINICI (valutazione regressione, stabilità o progressione di malattia)

Possono essere

UMORALI sostanze misurabili rilasciate dal tumore in circolo

TISSUTALI marcatori cellulari indicativi della natura neoplastica della cellula
marcatori cellulari del tessuto di origine della cellula neoplastica

Parole d'ordine:

SENSIBILITA', SPECIFICITA', VALORE PREDITTIVO POSITIVO

Solo markers con valore predittivo altamente positivo (buona sensibilità e specificità massimale) sono usati a fini diagnostici.

L'uso a fini clinici prevede invece la certezza a priori di associazione con un tumore (marker a specificità subottimale, quindi con possibilità più o meno elevata di falsi positivi se utilizzati in fase diagnostica)

2.a PREMESSA GENERALE

MARKERS UTILI PER LA REGISTRAZIONE

- 1) **MISURABILITA'** (MARKERS UMORALI)
RICONOSCIBILITA' (MARKERS TISSUTALI)
secondo tecniche standardizzate

- 2) **VALORE DIAGNOSTICO RICONOSCIUTO DALLA COMUNITA' SCIENTIFICA INTERNAZIONALE**
Le soglie per cui viene posta diagnosi di patologia possono variare nel tempo. Le nuove soglie hanno valore quando riconosciute dalla comunita' scientifica internazionale

- 3) NEL CASO DI MARKERS UMORALI, **LE LINEE GUIDA ENCR/IARC INDICANO QUELLI UTILIZZABILI PER POTER DEFINIRE LA MORFOLOGIA IN ASSENZA DI ISTOLOGIA.**
Tuttavia la loro utilizzabilità deve essere subordinata al criterio di cui al punto 2).
Esempio 1) PSA > non più utilizzabile
Esempio 2) variazione soglie di Ig circolanti e mieloma

Markers tissutali e immunoistochimica

SCORE DI VALORE DIAGNOSTICO

Rilevanza del problema diagnostico
Applicabilità a materiale istologico di routine e riproducibilità
Frequenza di utilizzazione

0 (-)	Inutile/obsoleto
1 (*)	Raramente applicato/ di scarsa utilità
2 (**)	Utile in particolari contesti specialistici
3 (***)	Importante
4 (****)	Fondamentale (ogni laboratorio diagnostico dovrebbe utilizzarlo)

SCORE DI PERFORMANCE

Riproducibilità della immuno-colorazione in condizioni "normali"
Applicabilità su materiale istologico di routine
Necessità di applicare metodi di smascheramento antigenico (Antigen Retrieval)

(C)	applicabile solamente su sezioni da materiale bioptico congelato
(P*)	buoni risultati su incluso in paraffina solo con metodi complessi
(P**)	Buoni riproducibilità e risultati a diluizioni medio/basse
(P***)	Ottimi riproducibilità e risultati anche ad elevate diluizioni

MARKERS IN EMATOLOGIA E PERCORSO DIAGNOSTICO

Siti consigliati <http://www.siematologia.it>

<http://www.ematologiainprogress.net/web/>

ESAME EMOCROMOCITOMETRICO CON FORMULA LEUCOCITARIA

Conteggi cellulari, misure di volume e di contenuto, proporzioni, istogrammi di distribuzione. Procedure automatiche standardizzate

STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO

In microscopia ottica. Allestimento, colorazione e osservazione standardizzati.

A bassa risoluzione: qualità della distribuzione, eventuali aggregati, individuazione cellule patologiche.

Ad alta risoluzione (x50,x100): conta cellulare (su n. elementi superiore rispetto alla formula leucocitaria), ricerca micromegacariociti e nuclei nudi (evocano danno midollare)

In presenza di blasti:

- colorazione per la mieloperossidasi **LINEA GRANULOCITICA**
- citochimica per le esterasi non specifiche (NSE) > **LINEA MONOCITICA**
- colorazione con il Blu di Toluidina per granulazioni basofile

Se le cellule patologiche sono indifferenziate come morfologia e citochimica > IMMUNOFENOTIPO

MARKERS IN EMATOLOGIA E PERCORSO DIAGNOSTICO

QPE – QUADRO PROTEICO ELETTROFORETICO

Per evidenziare componenti umorali monoclonali (Ig)

DOSAGGI IgG IgA IgM e IMMUNOFISSAZIONE

DOSAGGIO PROTEINURIA DI BENCE-JONES NELLE 24 ORE

DOSAGGI E RAPPORTI CATENE κ/λ IN SIERO E URINE

NEOPLASIE IMMUNOPROLIFERATIVE (MGUS, MIELOMA, WALDENSTROM)

LINFOMA LINFOPLASMOCITOIDE

MARKERS IN EMATOLOGIA E PERCORSO DIAGNOSTICO

AGOASPIRATO MIDOLLARE – standard ICHS 2008/WHO 2008

prima aliquota prelevata dal midollo osseo non contaminata con sangue periferico.

Allestimento:

- per apposizione :
- per striscio: consente maggiore dettaglio

MIELOGRAMMA su 500 elementi nucleati ad alto ingrandimento (x100)

Deve includere : blasti, promonociti, promielociti, mielociti, metamielociti, neutrofilo a banda, neutrofilo segmentato, monociti, eosinofili, basofili, mastcellule, precursori eritroidi, linfociti e plasmacellule (no megacariociti e cellule stromali)

NB sangue periferico e sangue midollare sono diversi

Se la cellularità è bassa o c'è contaminazione da sangue periferico il mielogramma non è rappresentativo > BIOPSIA MIDOLLARE

MARKERS IN EMATOLOGIA E PERCORSO DIAGNOSTICO

% BLASTI in striscio periferico e mielogramma (diagnosi, controlli, PD)

Nel midollo ipoplasico l' IDENTIFICAZIONE BLASTI CD34+ è con biopsia osteomidollare

SOGLIA BLASTI 20%

Per diagnosi differenziale tra leucemia acuta (LA) e sindrome mielodisplastica (MSD).

Fanno eccezione le leucemie acute con le seguenti alterazione citogenetiche ricorrenti:

LMA con t(8;21)(q22;q22)

LMA con inv(16)(p13.1;q22) o (16;16)(p13.1;q22)

Nel conteggio dei blasti sono inclusi blasti mieloidi , monoblasti e megacarioblasti e in più

- gli eritroblasti nella Leucemia eritroide pura

- i promonociti nel conteggio dei "monoblasti" nella LMA

monoblastica/monocitica/mielomonocitica

- i promielociti abnormi nella Leucemia acuta a promielociti

I piccoli megacariociti displastici e i micro-megacariociti non sono contati come blasti.

MARKERS IN EMATOLOGIA E PERCORSO DIAGNOSTICO

SOGLIE DI CELLULE DISPLASTICHE

10% di elementi di linea cellulare nel MO per le SMD

50% degli elementi per linea cellulare nelle LMA con alterazioni displastiche correlate

ELEMENTI DESCRITTIVI DELLA DISERITROPOIESI

multinuclearità

nucleo polilobulato

alterazioni megaloblastiche

vacuolizzazioni citoplasmatiche

sideroblasti ad anello

abnorme PAS positività degli eritroblasti

...

ELEMENTI DESCRITTIVI DELLA MIELODISPLASIA

variabilità delle dimensioni cellulari

ipolobularità o ipersegmentazione nucleare

granulazioni abnormi o ipogranularità/assenza di granulazioni

presenza di corpi di Auer

ELEMENTI DESCRITTIVI DELLA DISPLASIA DEI MEGACARIOCITI

micro-megacariocita

ipolobularità nucleare

multinuclearità

MARKERS IN EMATOLOGIA E PERCORSO DIAGNOSTICO

CITOFUORIMETRIA

nel sangue periferico, nel sangue midollare ovvero in altri liquidi biologici (aspirato di linfonodo, etc)

Le cellule sospese in fase liquida passano sotto una luce laser, ed i fluorocromi emettono segnali di luce:

- dispersa in avanti (**forward scatter -FSC**) valuta dimensioni delle cellule,
- riflessa a 90° (**side scatter - SSC**) valuta morfologia cellulare (granulosita' del citoplasma, rapporto nucleo/citoplasma, rugosita' di superficie)

I segnali luminosi vengono digitalizzati ed analizzati.

FSC ed SSC possono essere utilizzati per identificare differenti popolazioni cellulari

Usando anticorpi monoclonali (AbMo), coniugati a fluorocromi, le differenti popolazioni cellulari si possono caratterizzare sulla base di specifici antigeni presenti sulla membrana citoplasmatica cellulare (IMMUNOFENOTIPO)

Panel standard gruppo EGIL: 27 antigeni per leucemie acute

23 per patologie linfoproliferative

NB La citofluorimetria non deve essere usata per quantificare i blasti (microscopio = GOLD STANDARD)

MARKERS IN EMATOLOGIA E PERCORSO DIAGNOSTICO

IMMUNOFENOTIPO IN CITOFUORIMETRIA

Consente di classificare le cellule

- come linea di appartenenza**
- come livello di maturazione**
- evidenziando clonalità.**

RUOLO

- diagnostico in tutte le forme indifferenziate, consentendo di distinguere LLA o LMA**
- rileva popolazioni leucemiche megacarioblastiche o eritroidi**
- in caso di particolari pattern antigenici indica la presenza di alterazioni molecolari o citogenetiche ricorrenti specifiche di talune LAM**

GOLD STANDARD DIAGNOSTICO NELLE PATOLOGIE LINFOPROLIFERATIVE

perché consente di riconoscere le sottopopolazioni linfocitarie, e di stabilire il livello differenziativo e funzionale della popolazione cellulare analizzata

Indagini citofluorimetriche di primo livello nella Leucemia Acuta

CD45 (pan-ema) monociti maturi, granulociti, linfociti e precursori eritroidi

Le popolazioni rimanenti (area CD45dim/SSC basso-intermedio) sono in genere normali cellule emopoietiche immature o blasti.

cCD3 e cCD79a (c=citoplastatica) blasti già reclutati verso linee linfoidi T o B (LLA)

mieloperossidasi (MPO) cellule mieloidi (LMA).

Le LMA con differenziazione minima ed alcune LMA monocitiche possono essere MPO-

TdT (deossiribonucleotidil transferasi terminale) enzima di riparazione del DNA sempre presente nel nucleo dei blasti linfoidi B ed in alcuni casi di LMA immature. E'

assente nei linfomi: consente di differenziare LLA dalle altre malattie linfoproliferative.

CD19 prime fasi di differenziazione della linea B: in associazione con CD79a e TdT permette di identificare i blasti linfoidi della linea B.

CD3 di superficie cellulare se assente ma con cCD3-positività, indica una LLA-T.

CD13 e CD33 insieme con la MPO, e con negatività di marcatori linfoidi-associati (CD79a, cCD3 e TdT) identifica i blasti come LMA.

CD34 marcatore di immaturità delle cellule staminali normali, è frequente nei blasti delle LA.

CD34+ CELLULE IN DIVISIONE

CD34- CELLULE QUIESCENTI

Indagini citofluorimetriche di primo livello nelle Malattie Linfoproliferative

Scopi: clonalità e linea cellulare

Lo studio del fenotipo si esegue su sangue periferico, midollo osseo, sospensioni cellulari di biopsie linfonodali, liquido ascitico e cerebrospinale.

Rapporto catene leggere $k/\lambda \geq 3/1$ indicativo per proseguire l'approfondimento

CD19 marcatore delle malattie linfoproliferative di linea B (+ CD5)

CD3 marcatore delle malattie linfoproliferative di linea T (+ Cd3, CD4 e CD8)

CD56 marcatore delle malattie linfoproliferative di linea NK

Indagini citofluorimetriche di secondo livello nella Leucemia Acuta

Si ottengono specifiche informazioni sul livello di differenziazione e sullo stadio maturativo del clone leucemico

CD117 recettore per il fattore di crescita delle cellule staminali (stem cell factor - SCF) presente su cellule staminali, su alcuni precursori emopoietici midollari e su mastociti maturi (nel 75% delle LMA)

HLA-DR (MHC classe II) presente su cellule staminali (LA indifferenziate, LMA con differenziazione granulocitica o monocitica)

CD14 espresso dai monociti normali, serve per valutare LMA con differenziazione mielo-monocitica.

CD65 e CD15 appaiono precocemente nei blasti orientati in senso granulocitico: il CD65 è più specifico

CD11b glicoproteina espressa normalmente nella serie granulocitica dallo stadio di promielocita e nella serie monocitica dallo stadio di monoblasto.

CD11b con CD11c distingue i blasti differenziati in senso granulocitico (non la LAP) o monocitico .

CD16 presente in meno del 25% delle LMA a differenziazione granulocitica.

CD11b e CD16 caratterizzano i neutrofili maturi dalle restanti popolazioni cellulari.

CD11b con CD64 identifica il compartimento monocitico

CD123 recettore per l'IL-3, caratterizza il sottogruppo di LA a cellule staminali

CD10 identifica la LLA "common" (sottotipo B-II) e presente in LLA dell'infanzia e dell' adulto, in LLA B-III, nei linfomi non Hodgkin B-maturi, incluso il linfoma di Burkitt, ed alcune LLA-T.

CD7 e CD2 marker precoci della maturazione midollare dei linfociti T identificano gli stadi più immaturi di LLA (T-I e T-II)

CD5 con CD1a definiscono la LLA T-III, coespressi insieme a CD4 e CD8.

CD3 con CD4 o CD8 indicano lo stadio più maturo della LLA-T (T-IV) in assenza del CD1a.

Indagini citofluorimetriche di secondo livello nelle Malattie Linfoproliferative

CD23 con CD5 conferma la diagnosi di LLC-B

CD10 e CD38 linfoma follicolare, linfoma di Burkitt, molti linfomi diffusi a grandi , linfoma linfoblastico-B

CD20 aumenta intensità di espressione con la maturazione, ed è debole nella LLC-B

CD43 e CD200 iperespressi in LLC ed in una parte dei linfomi della zona marginale.
Il linfoma mantellare invece è CD200-

CD7- associato a CD4+ indica il linfoma cutaneo sindrome di Sézary.
Se presente anche CD10+ di deve valutare diagnosi differenziale con il linfoma T angioimmunoblastico

CD57 e CD16 associati alla ricerca intracitoplasmatica di **granzima B** e della **perforina** indicano una malattia a cellule NK

MARKERS IN EMATOLOGIA E PERCORSO DIAGNOSTICO

CITOGENETICA

GOLD STANDARD DIAGNOSTICO DI DIVERSE LEUCEMIE MIELOIDI E LINFOIDI

Imprescindibile anche nella definizione prognostica e nel follow up.

L'INSORGENZA DI MALATTIA E' ASSOCIATA ALLA PRESENZA DI ALTERAZIONI CROMOSOMICHE

Geni per fattori di trascrizione

Anomalie regolazione del sistema emopoietico e dei processi apoptotici

ONCOGENI: promuovono la proliferazione cellulare

GENI MUTATORI: mantengono l'integrità del genoma durante la replicazione

ONCOSOPPRESSORI: i loro prodotti inibiscono la proliferazione cellulare

Presenza in circa il 50% dei pazienti con sindromi mielodisplastiche (SMD)

Alterazioni cromosomiche associate a citopenia persistente consentono di porre diagnosi presuntiva di MDS, anche in assenza di evidenze morfologiche di displasia.

NB Neoplasie mieloidi e linfoidi con eosinofilia e alterazioni di *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1* nuovo gruppo di leucemie identificate non più sulla base della linea di appartenenza, mieloide o linfoide, ma sulla presenza di una specifica alterazione molecolare

CITOGENETICA CLASSICA - CARIOGRAMMA

Su cellule bloccate in metafase, fornisce informazioni sull'intero genoma.

PERMETTE DI VALUTARE I RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI con un limite di risoluzione di 5 Mbasi

Con la **tecnica del bandeggiamento** (Caspersonn 1968) i cromosomi vengono colorati a formare bande chiare alternate a bande scure

11q23 indica Cromosoma 11

estremità braccio lungo q

banda 2

sottobanda 3

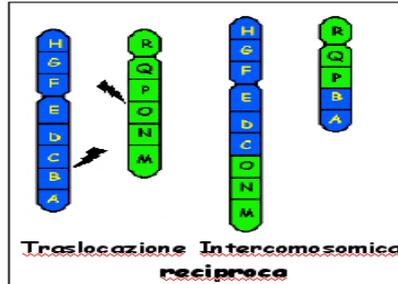
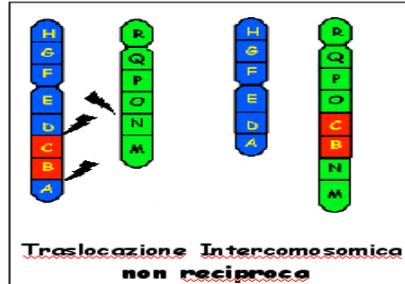
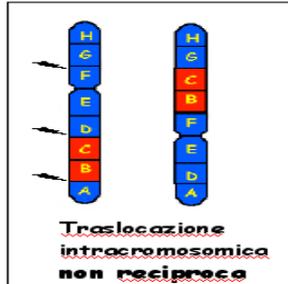
POSSIAMO AVERE DELEZIONI, INVERSIONI, DUPLICAZIONI E TRASLOCAZIONI

TRASLOCAZIONI (t)

Traslocazioni

SI DISTINGUONO IN:

- INTRACROMOSOMICHE E INTERCROMOSOMICHE
- RECIPROCHE E NON RECIPROCHE



Deregolazione dell'espressione genica: overespressione o espressione aberrante in un tessuto che normalmente non esprime quel gene.

Espressione di una proteina di fusione: giustapposizione di sequenze geniche codificanti di due geni localizzati su differenti cromosomi

GENI DI FUSIONE

Sono oncogeni associati a traslocazioni cromosomiche specifiche, generati dalla ricombinazione tra due geni.

Danno origine a m-RNA chimerici il cui prodotto e' espresso ed e' neoplastico **se entrambi i due oncogeni sono funzionanti.**

TRASLOCAZIONI CITOGNETICHE RICORRENTI

- Rappresentano il 15-20% delle LAM
- Sono alterazioni del "core binding factor", complesso proteico essenziale per l'ematopoiesi
- Il complesso, se mutato, determina un blocco trascrizionale e differenziativo
- Hanno prognosi favorevole

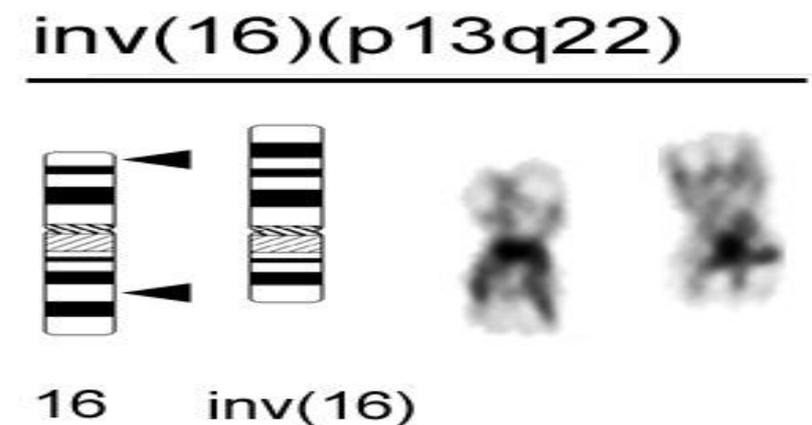
Nella **Leucemia promielocitica, FAB M3 APL**, la traslocazione $t(15;17)$ coinvolge il gene che codifica per il recettore nucleare a dell'acido retinoico (**RAR α**) sul cromosoma 17, ed il gene PML (promielocitica) sul cromosoma 15. $t(15;17)(q22;q21)$. Rispondono alla terapia con ac.retinoico.

Varianti:

$t(11;17)(q23;q22)$ PLZF-RAR α ; $t(5;17)(q35;q21)$ NPM-RAR α ;
 $t(11;17)(q13;q21)$ NuMA-RAR α ; $t(17;17)(q11;q21)$ STAT5b-RAR α ;

Nelle **leucemie acute mieloblastiche, FAB M2** la traslocazione $t(8;21)$ induce il riarrangiamento AML1-ETO e la formazione di una proteina ibrida. Tipica dei giovani, è meno aggressiva e risponde alle terapie

Nella **Leucemia mielomonocitica acuta con eosinofili, FAB M4eo**, l'inversione (16) agisce sul gene di fusione **CBFB-MYH11**



t(9;22)(q34;q11) e varianti, potenzia l'attività tirosin-chinasica di BCR-ABL1. Tipica della LMC, presente anche in leucemie con fenotipo misto e in circa il 25% delle LLA dell'adulto

- **t(5;12)(q31~33;p12)** nelle neoplasie mieloidi associate a eosinofilia con riarrangiamento PDGFRB
- **t(8;21)(q22;q22), t(16;16)(p13.1;q22) o inv(16)(p13.1;q22) e t(15;17)(q22;q12)** identificano un gruppo di LMA con traslocazione citogenetica ricorrente in cui per la diagnosi è sufficiente il riscontro dell'alterazione citogenetica
- **t(9;11)(q22;q23), t(6;9)(p23;q34), t(3;3)(q21;q26.2) o inv(3)(q21;q26.2) e t(1;22)(p13;q13)** LMA con traslocazione citogenetica ricorrente, ma per la diagnosi è indispensabile il riscontro di una quota di blasti nel SP e/o nel MO $\geq 20\%$

t(9;22), (p11;q23), t(12;21)(p13;q22), t(5;14)(q31;q32) e t(1;9)(q23;p13.3) gruppo di leucemie/linfomi linfoblastici B con traslocazione citogenetica ricorrente. Sono comprese anche quelle forme con corredo cromosomico iperdiploide ($>20 <66$ cromosomi) o ipodiploide (<46 cromosomi)

- **t(4;11)(q21;q23)** frequente nella LLA-B non altrimenti specificata
- **t(8;14)(q24;q11)** si riscontra nella LLA-T
- **t(11;18)(q21;q1), t(1;14)(p22;q32) e t(3;14)(p14.1;q32)** frequenti nei linfomi extranodali della zona marginale dei tessuti linfoidei associati alla mucosa (linfomi MALT)
- **t(14;18)(q32;q21)** in oltre il 90% dei pazienti con linfoma follicolare
- **t(11;14)** nel linfoma mantellare e in circa il 40% dei soggetti con amiloidosi;
- **t(8;14)(q24;q32)** nella maggior parte dei pazienti con linfoma di Burkitt
- **t(2;5)(p23;q35)** in oltre l'80% dei casi di linfoma anaplastico a grandi cellule ALK-positivo

INVERSIONE (inv) rotazione a 180° di un segmento di cromosoma
inv(14)(q11;q32) rappresenta l'alterazione caratteristica della leucemia a prolinfociti T

DELEZIONE (del) perdita di un segmento di cromosoma, all'interno o ad un estremo
del(5q), del(7q) e del(20q) sono frequenti nelle SMD e nelle LMA
del(6q) e del(9p) nelle T-LLA
del(13q14.3) nella LLC
del(4)(q12) nelle neoplasie linfoidi e mieloidi con riarrangiamento *PDGFRA*

ISOCROMOSOMA (i) cromosoma strutturalmente alterato per delezione di un braccio associata a duplicazione dell'altro braccio

- i(9q), i(17q) e i(22q)** nella LMC
- **i(X)(q13), i(17q) e i(21q)** nelle sindromi mielodisplastiche;
- **i(11q), i(17q) e i(21q)** nelle LMA
- **i(7q), i(9q) e i(17q)** nelle LLA
- **i(1q), i(6p), i(7q) i(8q), i(9p), i(17q) e i(21q)** nelle neoplasie linfoproliferative.

MONOSOMIA _perdita di uno dei due cromosomi omologhi del corredo genetico cellulare.
monosomia 7 si riscontra nel 25% dei pazienti con leucemia mielomonocitica juvenile
monosomie 5, 7 e 13 utilità prognostica nelle SMD ; frequenti nelle forme secondarie.

TRISOMIA _presenza di un cromosoma aggiuntivo.

trisomia 21 identifica la sindrome di Down (SD): nel 10% di neonati presente una emopoiesi transitoria anomala indistinguibile dalla leucemia mieloide acuta. I soggetti con SD hanno una incidenza di LA nei primi 5 anni di vita 50 volte superiore rispetto alla popolazione non Down.
trisomie 3 e 18 si riscontrano nei Linfomi MALT
trisomie 8 e 13 si trovano nelle SMD

CITOGENETICA AVANZATA

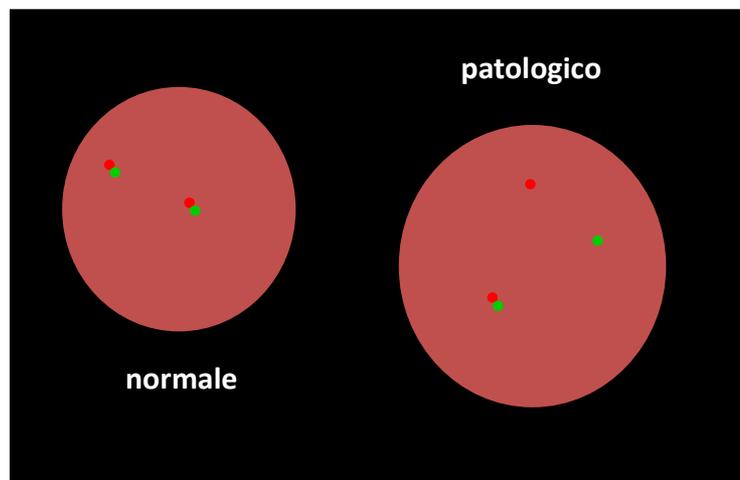
FISH: Fluorescence In Situ Hybridation

Analisi del DNA mediante sonde marcate con fluorocromi emittenti a diverse lunghezze d'onda utilizzabile anche su nuclei in interfase

Consente di valutare riarrangiamenti di alcune centinaia di Kbasi

Non è in grado di identificare mutazioni puntiformi

Risultato atteso



Nella **Leucemia mieloide acuta, FAB M5**, vi sono anomalie della banda cromosomica 11q23 con riarrangiamenti del gene MLL (Myeloid/Lymphoid Leukemia), noto anche come ALL1 (Acute Lymphoblastic Leukemia) o HRX.

Questi riarrangiamenti si ritrovano anche in LLA e in leucemie acute scarsamente differenziate o bifenotipiche.

FISH: applicazioni

Leucemia mieloide cronica (LMC)

ricerca della traslocazione bilanciata 9;22 con formazione del gene di fusione *BCR/ABL*

Neoplasie mieloproliferative croniche Philadelphia negative come test di conferma
Esclusa la presenza della t(9;22), si possono rilevare diverse alterazioni citogenetiche, descritte in circa il 30% delle mielofibrosi e delle policitemie vere, più rare nella Trombocitemia Essenziale (trisomie 8 e 9, del(13q) e del(20q))

Sindromi mielodisplastiche (SMD)

alterazioni cromosomiche in circa il 50% delle SMD-de novo ed in circa l'80% delle SMD therapy-related
La FISH esplora le alterazioni che sono più frequentemente associate a questi disordini: trisomia 8, del(5q)/monosomia 5, del(7q)/monosomia 7, del(20q), -Y.

Leucemia mieloide acuta (LMA)

L'analisi citogenetica convenzionale con bandeggio cromosomico rimane il Gold standard

La FISH tuttavia è in grado di identificare quelle alterazioni ricorrenti che fanno classificare un tipo di leucemia come "LMA con alterazioni citogenetiche ricorrenti" (t(8;21) , t(15;17), inversione del 16, la t(16;16), traslocazione del gene MLL (segmento 11q23), traslocazione del gene RAR α ,

FISH: applicazioni

Leucemia linfatica cronica (LLC)

alterazioni cromosomiche in circa l'80% dei pazienti , alcune associate a peggior prognosi o a diversa risposta terapeutica.

Nel 50% dei casi c'è del(13q).

Linfoma non Hodgkin (LNH)

t(14;18) del linfoma follicolare, t(11;14) del linfoma mantellare , t(8;14) del linfoma di Burkitt o altre coinvolgenti il gene *MYC*.

Mieloma multiplo (MM)

Analogamente alla LLC, si può ricercare del(13q) o del(17p) e le traslocazioni che riguardano il locus delle catene pesanti delle Immunoglobuline (IgH) situato sul cromosoma 14

Leucemia linfoblastica acuta (LLA)

per identificare la t(9;22) con punto di rottura del gene *BCR* differente rispetto alla LMC

Altra anomalia, frequente soprattutto nel bambino, è quella che coinvolge il gene *MLL*, segmento 11q23.

Ulteriori evoluzioni della FISH

M-FISH/SKY: multiplex fish, con uso di 24 sonde colorate per tutti i cromosomi e assegnazione di un colore per ciascun cromosoma utile per l'analisi di alterazioni cromosomiche complesse. Individuati o ridefiniti riarrangiamenti cromosomici in almeno il 50% di LMA/LLA

COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDATION

Identifica alterazioni genetiche in termini di Gain (guadagno=verde) o Loss (perdita=rosso) di DNA.

Non rileva riarrangiamenti bilanciati e non è informativa sulla natura delle alterazioni

BIOLOGIA MOLECOLARE

PCR Polymerase Chain Reaction

Analisi del DNA previa amplificazione di segmenti del DNA grazie ad enzimi.

Consente di valutare trascritti o le regioni di fusione, riarrangiamenti e mutazioni ricorrenti di oncogeni.

Il danno viene valutato a livello di esone.

nested-PCR tecnica di amplificazione che aumenta la sensibilità

real-time PCR consente di quantificare le copie del trascritto mediante l'uso di sonde fluorescenti che vengono incorporate nel trascritto

Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR PCR abbinata all'uso di enzimi per individuare mutazioni che alterano il sito di restrizione dell'enzima.

PCR - Applicazioni

BCR-ABL nested-RT PCR su RNA isolato da sangue midollare o periferico
gene di fusione marcatore molecolare della LMC. Presente anche nel 5% delle leucemie linfoblastiche acute (LLA) del bambino, dal 20 al 50% delle LLA dell'adulto e in <2% dei casi di leucemia mieloide acuta (LMA) dell'adulto.

Identifica anche i pazienti candidabili ad una terapia mirata con inibitori delle tirosin-chinasi (imatinib, etc) in grado di indurre remissioni ematologiche, genetiche e molecolari della malattia.

PML-RAR α nested RT-PCR
gene di fusione nelle leucemie acute a Promielociti (LAP) con la traslocazione t(15;17)(q22;q21)

AML1-ETO RT-PCR
gene di fusione dovuto a traslocazione t(8;21)(q22;q22), presente nel 7% delle LMA

CBFB-MYH11 RT-PCR
gene di fusione dovuto a inv(16)(p13;q22) o a t(16;16)(p13;q22), di difficile identificazione con la citogenetica convenzionale, mentre il trascritto di fusione *CBFB-MYH11* viene comunemente identificato
5-8% di tutti i casi di LMA

PCR - Applicazioni

FLT3

RT-PCR

recettore di membrane ad attività tirosin-chinasica mutato in circa 1/3 dei pazienti con LMA

NPM1

diversi tipi di PCR su DNA o RNA

gene della nucleofosmina mutato nel 30% delle LAM (50-60% delle forme con cariotipo normale) con circa 50 varianti

Le mutazioni di *NPM1* si associano a negatività per *CD34*, cariotipo normale nel 85% dei casi, variabilità morfologica con interessamento multilineare, maggiore frequenza nelle LMA de novo e negli adulti

La ricerca della dislocazione citoplasmatica di *NPM1* in immunohistochimica su biopsie osteomidollari è già predittiva al 100% per la presenza delle mutazioni di *NPM1*

JAK2

PCR allele specifica, amplificata per mutazione dell'esone 6

Il gene *JAK2* (Janus Kinase 2) codifica per una tirosin-chinasi citoplasmatica fondamentale nella trasduzione del segnale da parte di molteplici fattori di crescita.

La mutazione di *JAK2* V617F dell'esone 14 è frequente nelle neoplasie mieloproliferative

- 96% dei pazienti con PV

- 55% dei casi di TE

- 65% dei casi di mielofibrosi idiopatica

- meno frequente si riscontra in sindromi mielodisplastiche e LAM.

-Le mutazioni di *JAK2* dell'esone 12 nel 2% dei pazienti con policitemia vera

PCR - Applicazioni

Riarrangiamenti dei geni delle IgH

multiplex PCR

(Gene IgH = gene per le catene pesanti delle immunoglobuline)

per valutare l'origine mono- o poli-clonale di una popolazione cellulare di linfociti B.

Riarrangiamenti dei geni del TCR

PCR

(gene TCR = gene T-cell receptor)

per valutare l'origine mono- o poli-clonale di una popolazione di linfociti T

t(11;14)

t(11;14)(q13;q32)

Caratteristica del linfoma mantellare ed è sporadica in altre malattie linfoproliferative B. Si ha attivazione trascrizionale del **gene ciclina D1**.

Sia l'espressione della ciclina D1 e/o la presenza della t(11;14)(q13;q32) sono elementi aggiuntivi della diagnosi differenziale dei linfomi B.

La PCR si usa per monitorare la malattia minima residua (**Gold standard in diagnosi è la FISH**)

t(14;18)

Presente nel 90% dei linfomi follicolari e nel 20% dei linfomi diffusi a grandi cellule B.

La PCR viene usata per monitorare la malattia minima

PCR - Applicazioni

FIP1L1-PDGFR

nested-RT-PCR

gene di fusione che si forma per delezione a livello del cromosoma 4q12

Associato a leucemia eosinofila cronica, a leucemia mieloide acuta o leucemia/linfoma linfoblastico T con eosinofilia

La classificazione WHO identifica come nuova entità nosografica le neoplasie mieloidi/linfoidi con eosinofilia associate a *FIP1L1-PDGFR*. Diverse geni di fusione varianti sono stati descritti, che vedono il gene *PDGFR* fuso ad altri partner genici, quali *KIF5B*, *CDK5RAP2*, *STRN*, *ETV6* e *BCR*.

Mutazione c-Kit D816V

diversi tipi di PCR

Il proto-oncogene c-kit codifica per un recettore ad attività tirosin-chinasica transmembrana.

Dopo essersi legata con lo Stem Cell Factor, c-kit dà il via all'attivazione della tirosin-chinasi intrinseca del recettore promuovendo proliferazione, maturazione e sopravvivenza cellulare.

Mutazioni di c-kit sono state descritte in diverse neoplasie.

La mutazione attivante D816V di c-Kit si ritrova in circa l'80% dei casi di mastocitosi

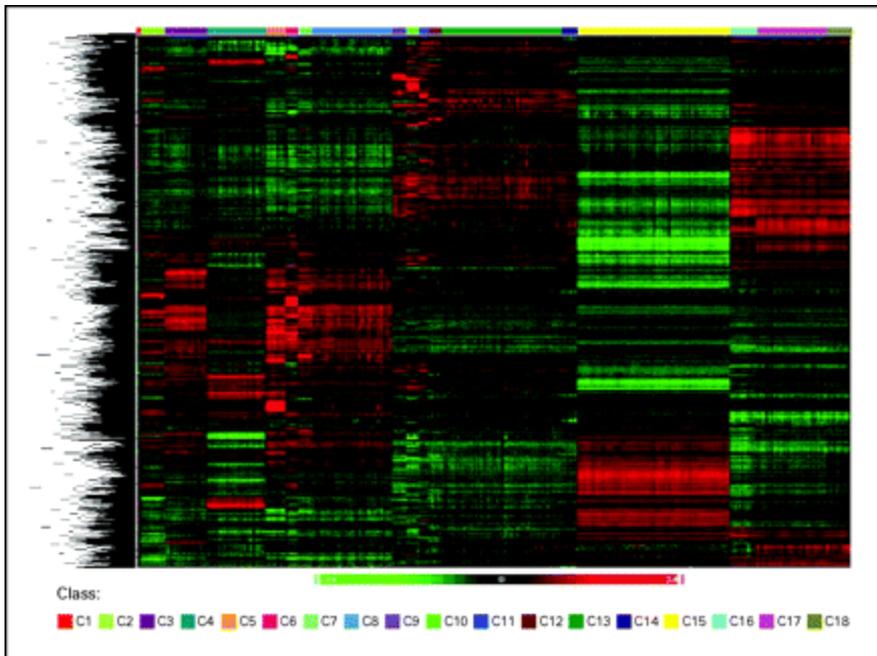
BIOLOGIA MOLECOLARE

GEP - GENE EXPRESSION PROFILING

Basato sulla tecnologia dei microarray e usato in studi clinici

Valuta l'espressione contemporanea di migliaia di geni, e così si definiscono i profili di espressione genica associati a sottoclassi di una nosologia definita.

Utilizzato per ora in ambito di ricerca.



Clinical Utility of Microarray-Based Gene Expression Profiling in the Diagnosis and Subclassification of Leukemia: Report From the International Microarray Innovations in Leukemia Study Group
Haferlach and C. *JCO* May 20, 2010 vol. 28 no. 15

BIOPSIA OSTEMIDOLLARE

Valuta struttura e architettura midollare.

Più sensibile dell'aspirato midollare per valutare infiltrazioni clonali minime. Meno sensibile per valutare la morfologia cellulare e la percentuale di distribuzione delle differenti classi cellulari.

INDICAZIONI DIAGNOSTICHE SU PAZIENTI

- con un midollo ipocellulato e/o aplastico e/o con fibrosi midollare;
- con prelievo di sangue midollare risultato inadeguato o insufficiente (punctio sicca);
- con lesioni focali sospette per patologie granulomatose e/o linfomatose;
- con pancitopenia associata a striscio periferico sospetto per fibrosi midollare e/o mieloftisi e/o presenza di metastasi tumorali;
- con neoplasia mieloproliferativa cronica Ph negativa;
- con mieloma multiplo;
- con citopenia periferica.

Stadiazione e follow up nelle neoplasie linfoproliferative (più sensibile dell'aspirato midollare)

Ruolo importante per la diagnosi differenziale tra policitemia vera (PV) trombocitemia essenziale (TE) e mielofibrosi primitiva (MP)

- panmielosi midollare associata a megacariociti iperlobati aggregati in cluster identifica la PV e la pre-PV,
- iperplasia megacariocitaria con megacariociti prevalentemente non aggregati, di dimensioni abnormi e con abbondante citoplasma identifica la TE
- la MP in fase prefibrotica ha ipercellularità con un aumento dei megacariociti che appaiono caratteristicamente pleiomorfici

Immunoistochimica in BIOPSIA OSTEMIDOLLARE

Primo Livello per identificare la linea cellulare neoplastica.

Neoplasie linfoproliferative

CD3 marcatore pan-T

CD20, CD79a e CD19 marcatori pan-B

MUM1/IRF4 fattore di regolazione dell'interferone (IRF) mutuamente esclusivo con il Bcl-6. Fortemente espresso nel mieloma multiplo, nel linfoma linfoplasmocitico, nel linfoma di Hodgkin e in quasi la metà dei linfomi diffusi a grandi cellule B CD10 negativi e Bcl-6 negativi e che hanno una prognosi peggiore.

CD30 nel sospetto di linfoma di Hodgkin

Neoplasie mieloidi

CD34 come conferma dei risultati di morfologia e citofluorimetria. Indispensabile per la diagnosi nelle forme ipocelulate o in quei casi di aspirato midollare insufficiente.

mieloperossidasi (MPO) per definire i blasti come appartenenti alla linea granulocitica. I piccoli megacariociti atipici nelle **CD42b o CD61** per visualizzare i piccoli megacariociti atipici

CD68 per confermare la presenza di macrofagi

CD117 o la triptasi per identificare i mastociti

Nel sospetto di metastasi di tumore solido

CD45 marcatore pan-leucocitario

CAM5.2 per la citocheratina

EMA (antigene epiteliale di membrana),

S100 per schwannomi, ependimomi e astrogliomi

Melan A per i melanomi.

Immunoistochimica in BIOPSIA OSTEMIDOLLARE

Secondo Livello per la formulazione diagnostica.

LNH-B

CD5, CD23 e CD10 per completare lo studio del fenotipo.

Bcl-6 fattore di trascrizione che sopprime p53 nei linfociti B del centro germinativo, iperespresso in numerosi LNH B, in particolare diffuso a grandi cellule.

ciclina D1 iperespressa nel LNH mantellare in quanto a causa di traslocazione t(11;14) (70% dei linfomi mantellari) o di riarrangiamento 11q23

Bcl-2 iperespresso nel linfoma follicolare e nel 20% dei linfomi di Burkitt.

Indica un'origine dal centro germinativo

Ki-67 espressa durante le fasi G1, G2, S ma assente nella fase G0. Indica frazione di crescita

ZAP70 marcatore prognostico della B-LLC, peraltro presente anche nelle neoplasie T-cellulari

TdT e CD34 in caso di Burkitt oppure di linfoma linfoblastico, per escludere una LLA

PAX-5, CD22 e CD79a citoplasmatico nella diagnosi di una LLA-B

CD25 e CD103 nel sospetto di hairy cell leukemia

Neoplasie linfoproliferative a cellule T

CD2, CD4, CD5, CD7, CD8 e CD25

CD30 per identificare il linfoma anaplastico a grandi cellule

CD10 nella diagnosi del linfoma T angioimmunoblastico. Il è CD4 e CD8 negativo

CD3 e recettore $\gamma\delta$ per il linfoma T epato-splenico

p80 ALK L'anticorpo anti-ALK riconosce le proteine chimeriche formate nelle t(2;5) che coinvolgono il gene ALK nel linfoma anaplastico a grandi cellule T/null

Immunoistochimica in BIOPSIA OSTEMIDOLLARE

Secondo Livello per la formulazione diagnostica.

Neoplasie linfoproliferative a cellule NK

CD56, CD57

perforina, granzima B e FAS mediatori citotossici

Linfoma di Hodgkin

CD30

CD15 per confermare la presenza delle cellule di Reed Sternberg

EBV-LMP1 proteina prodotta dal virus di Epstein Barr, essenziale per la trasformazione neoplastica dei linfociti B

FASCIN per diagnosi differenziale tra LH classico e a prevalenza linfocitaria

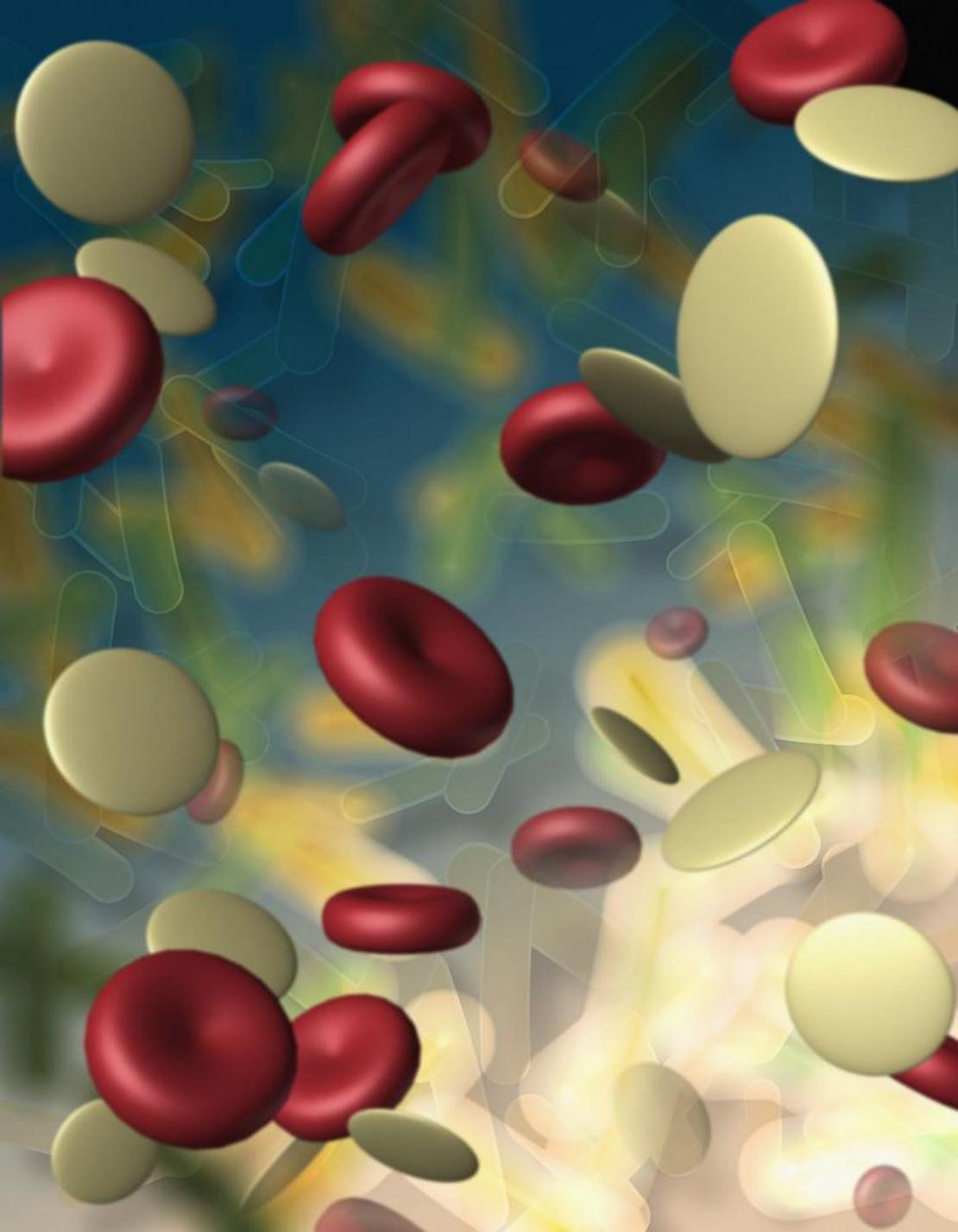
Neoplasie plasmacellulari

CD138 marcatore plasmacellulare

CD56 identifica le plasmacellule patologiche

Valutazione della clonalità

Anticorpi per le IgA, IgG, IgD e/o IgM



Grazie
per
l'ascolto