

**A.O. Ordine Mauriziano**  
**SC Anatomia Patologica - Laboratorio di Immunopatologia**

**Progetto di ricerca: “Messa a punto e validazione in citometria a flusso delle marcature intracellulari con valenza diagnostica e prognostica nei linfomi B non Hodgkin”**

Relazione finale

I linfomi non Hodgkin (LNH) sono stati nel corso degli ultimi decenni ampiamente studiati non solo dal punto di vista morfologico e fenotipico, ma anche genetico e molecolare. La crescita esponenziale delle conoscenze a nostra disposizione ha consentito lo sviluppo di tecniche utili alla formulazione di sistemi classificativi incentrati sulle caratteristiche istologiche, fenotipiche e genotipiche. L'immunofenotipizzazione è una delle componenti fondamentali dello schema di classificazione dei LNH e l'identificazione di numerosi biomarcatori ha permesso una ulteriore caratterizzazione di molti istotipi permettendo in questo modo un miglioramento dei criteri diagnostici di queste patologie e, in definitiva, anche un miglioramento degli approcci terapeutici.

L'ultima edizione della “WHO Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues” incorpora i nuovi dati clinici, prognostici, morfologici, immunofenotipici e genetici che sono emersi dagli ultimi studi.

Molti linfomi sono considerati entità distinte dal momento che presentano profili immunofenotipici caratteristici e alterazioni genetiche note. Entrambe queste “firme” biologiche possono essere studiate attraverso tecniche di laboratorio disponibili diffusamente quali l'immunoistochimica (IIC), la citofluorimetria (CFM) e la citogenetica molecolare.

Questo studio prevedeva la messa a punto e la validazione di tecniche citofluorimetriche per l'identificazione di marcatori intracellulari (intracitoplasmatici e nucleari) con valenza diagnostica e prognostica. Generalmente questi marcatori vengono ricercati mediante tecniche immunoistochimiche. Rispetto a queste ultime, la citofluorimetria permette marcature multiple sulla stessa popolazione cellulare patologica, quindi una maggiore specificità nell'identificazione della cellula neoplastica, una maggiore rapidità nell'ottenere il dato diagnostico e una migliore integrazione nella definizione di un profilo immunofenotipico delle cellule neoplastiche.

La recente disponibilità di nuovi sistemi analitici utili ad evidenziare fattori di trascrizione o antigeni nucleari che fino ad ora potevano soltanto essere testati con tecniche IIC consente l'introduzione di nuovi protocolli per l'identificazione in CFM di diversi antigeni intracitoplasmatici:

- MYC: Il gene MYC codifica un fattore di trascrizione che controlla un grande numero di geni coinvolti in regolazione del ciclo cellulare, metabolismo cellulare, riparazione degli acidi nucleici, risposta a stress cellulare e sintesi di proteine. Globalmente MYC promuove la proliferazione cellulare.

- Bcl-6: Il gene bcl-6 codifica una fosfoproteina nucleare che esplica funzioni di repressore trascrizionale. Può essere alterato da traslocazioni che si osservano in circa il 30% dei linfomi B a grandi cellule e nel 10% dei linfomi follicolari. L'espressione nucleare del prodotto bcl-6 è considerata un valido marcatore della natura centrollicolare di una popolazione linfoide B neoplastica.
- PAX5: Il gene PAX-5 codifica una proteina attivatrice specifica delle cellule B (BSAP), un marcatore di cellule B e relativi stadi di maturazione, e di neoplasie linfoblastiche di tipo B. Il prodotto del gene PAX-5 è espresso nella maggior parte dei casi di leucemie/linfomi non-Hodgkin a cellule B mature e loro precursori.
- SOX11: il gene SRY (regione del cromosoma Y per la determinazione del sesso)-box11 codifica per un fattore di trascrizione che viene normalmente espresso nel sistema nervoso centrale umano in fase di sviluppo. SOX11 è altamente specifico per il linfoma mantellare.
- MUM-1/IRF4: è espresso da plasmacellule ed in un sottotipo cellulare nella zona chiara del centro germinativo.

La messa a punto delle tecniche analitiche atte a identificare le molecole sopracitate ha richiesto diversi cicli di validazione, eseguiti mediante il confronto con le stesse marcature eseguite in IIC sugli stessi campioni, oppure impiegando linee cellulari che esprimono costitutivamente il marcatore in indagine, soprattutto in relazione al tipo di procedura da utilizzare per la corretta identificazione della proteina intracellulare.

Per la validazione finale dello studio sono stati analizzati parallelamente in CFM e IIC 100 campioni di linfoma B non Hodgkin comprendenti linfomi follicolari (FL), linfomi a grandi cellule B diffusi (DLBCL), linfomi B ad alto grado (HGBCL), linfomi di Burkitt (BL), linfomi della zona marginale (MZL), linfomi linfocitici/leucemia linfatica cronica (SLL/CLL).

Attualmente vengono impiegate tre tecniche preparative che prevedono tutte un primo passaggio di fissazione delle cellule e un secondo di permeabilizzazione durante il quale avviene anche la marcatura della proteina intracellulare con anticorpi monoclonali coniugati con un fluorocromo.

La fissazione viene eseguita con una soluzione di paraformaldeide allo 0,4% in tampone fosfato ed è un passaggio comune a tutte e tre le procedure analitiche.

La permeabilizzazione può essere eseguita con a) una soluzione di saponina allo 0,1%, b) una soluzione di saponina in tampone contenente fino al 30% di metanolo, c) una soluzione tampone a base di solo metanolo (generalmente al 50 o 70% dipende dalle formulazioni commerciali).

Le differenze delle tre tecniche sono nella maggiore permeabilizzazione che viene ottenuta dalle tre soluzioni utilizzate in ordine crescente da a) a c).

In altre parole, mentre la tecnica a) consente agevolmente di identificare antigeni citoplasmatici, le tecniche b) e c) sono più adatte agli antigeni intranucleari (quali fattori di trascrizione e regolatori del ciclo cellulare)

In pratica, i risultati ottimali per l'identificazione delle proteine MYC, Bcl-6, PAX5 e MUM-1/IRF4 sono stati ottenuti con la tecnica b), mentre per il fattore SOX11 nessuna delle tecniche utilizzate ha fornito risultati soddisfacenti, né su cellule di linfoma mantellare (di cui questo marcatore è target specifico) né su linee cellulari esprimenti costituzionalmente SOX-11.

Nel caso di MYC la messa a punto è stata eseguita sulla linea cellulare DAUDI che esprime costituzionalmente MYC ad elevati livelli. Tuttavia, nonostante una evidente reattività ottenuta sulla linea cellulare, la marcatura per MYC risulta generalmente più problematica delle altre e si osserva una sottostima della percentuale di cellule positive che va dal 30% al 70% in relazione al livello di espressione.

Nel caso di Bcl-6, di PAX5 e di MUM-1/IRF4 il numero percentuale di cellule positive in CFM è risultato correlare positivamente con il valore percentuale determinato in IIC con un numero minimo di casi discordanti.

In tutti i metodi di marcatura intracellulare messi a punto è stato possibile eseguire contestualmente l'analisi delle molecole di superficie, in particolare di quelle necessarie alla corretta identificazione della popolazione linfomatosa.

In conclusione, seppure con dei limiti derivanti dalla difficoltà di identificazione di specifiche proteine intracellulari, la messa a punto di queste tecniche e la loro successiva validazione per confronto con i dati ottenuti dalle tecniche convenzionali, ha consentito di determinare un profilo fenotipico estremamente dettagliato per la maggior parte dei linfomi B studiati. Ciò ha permesso un migliore e più rapido inquadramento diagnostico ed ha consentito di indirizzare con maggior specificità le successive indagini IIC.

La fase successiva dello studio sarà volta a valutare se il profilo immunofenotipico ottenibile in CFM integrato dai dati delle marcature intracellulari potrà essere utile come potenziale strumento prognostico considerando l'andamento clinico e la risposta alle terapie dei linfomi in questo modo diagnosticati.

Dr.ssa Martina Tesauro

Firmato in originale

Dr. Massimo Geuna

( Responsabile Scientifico)

Firmato in originale