
I marker tumorali nelle leucemie, Linfomi e mielomi

Camerino 11-13 Settembre 2013

Dr. Stefano Luminari
Modena
Dr. Adriano Giacomini
Biella

Classificazione dei marcatori tumorali circolanti

<p>a) Sostanze con struttura chimica ben definita</p>	<ol style="list-style-type: none">1) Prodotti fetali (antigene carcinoembrionale - CEA, α-fetoproteina - αFP)2) Ormoni (gonadotropina corionica umana - HCG, calcitonina)3) Enzimi (fosfatasi acida prostatica - PAP, antigene prostatico specifico - PSA, enolasi neurono specifica - NSE)4) Prodotti indifferenziati (tireoglobulina, cromogranine, proteina S100, ferritina, b-microglobulina)5) Citocheratine (TPA, Cyfra 21.1, TPA Cyk)
<p>b) Glicoproteine di secrezione appartenenti al gruppo delle mucine</p>	<p>CA19.9, CA50, CA195, CA72.4, CA125, CA15.3, CA549, MCA ecc.</p>
<p>c) Marcatori tumorali circolanti legati ad alterazioni geniche e identificati con sonde molecolari</p>	<p>Prodotti di oncogeni ed oncosoppressori (c-erbB2, p53), cellule tumorali identificate da sonde molecolari nei tumori della prostata (PSA-mRNA), del tratto colon-rettale (cyt20-mRNA, k-ras mRNA, p53 mRNA), della tiroide (TG-mRNA) ecc.</p>

MARCATORI TUMORALI E PRATICA CLINICA

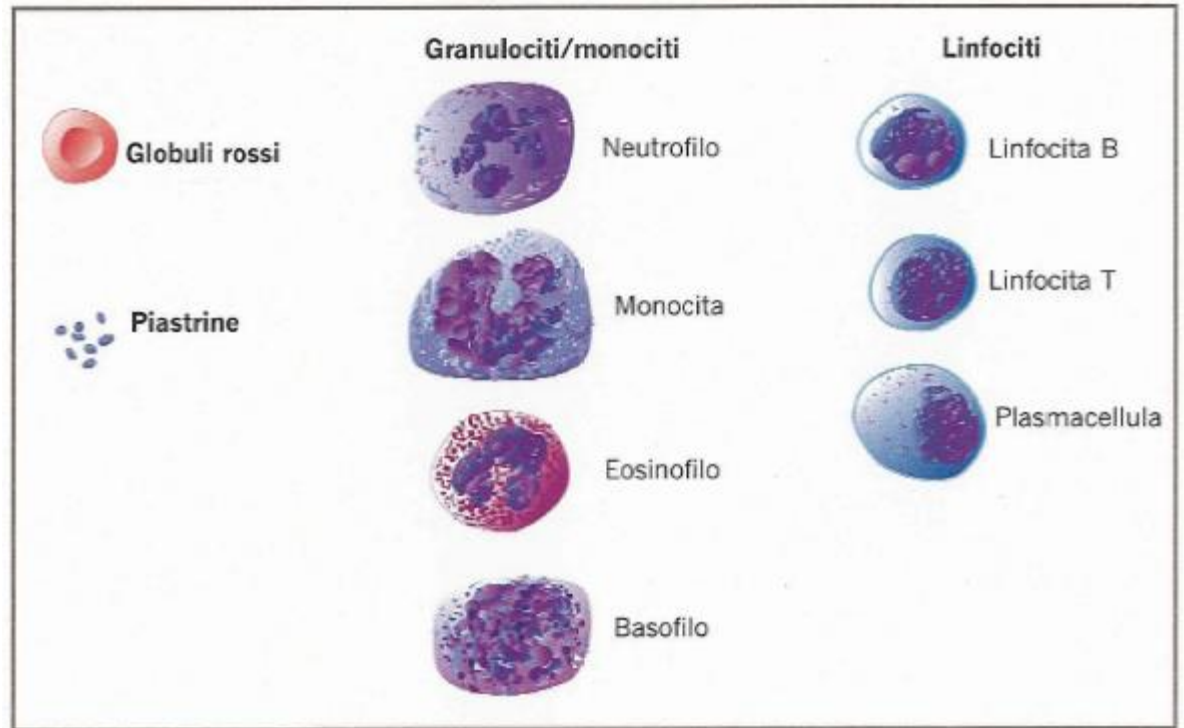
- Diagnosi differenziale:
 - Markers diagnostici
- Caratterizzazione biologica:
 - Indicatori di aggressività/prognosi
 - Target terapeutici
- Monitoraggio terapia :
 - Efficacia dei trattamenti
 - Malattia residua minima

Malattie oncoematologiche

- Gruppo di neoplasie che originano dalle cellule mature del sangue e del sistema immunitario o dai loro precursori:

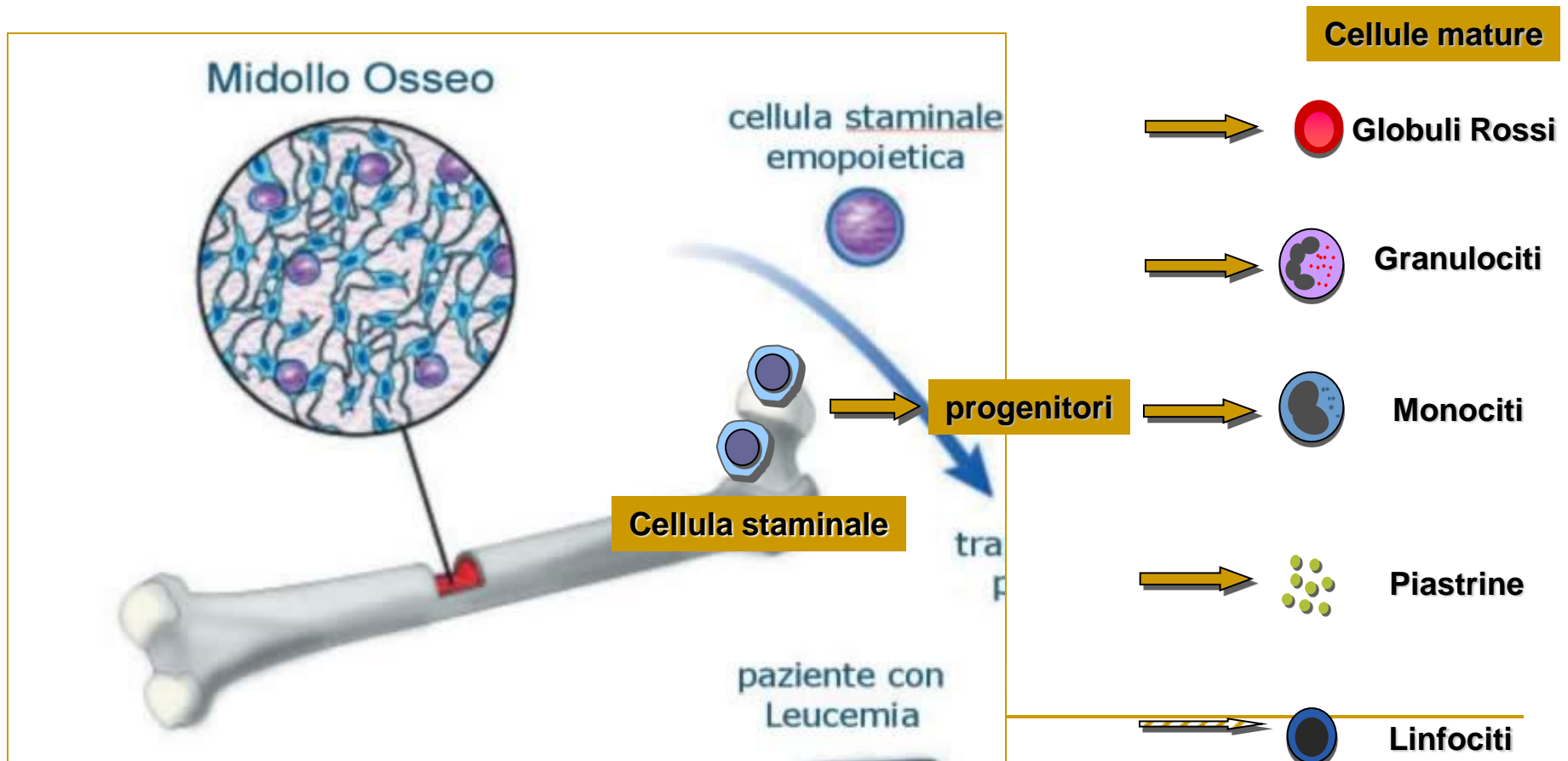
Le cellule del sangue

I principali tipi di cellule ematiche: eritrociti, leucociti, piastrine



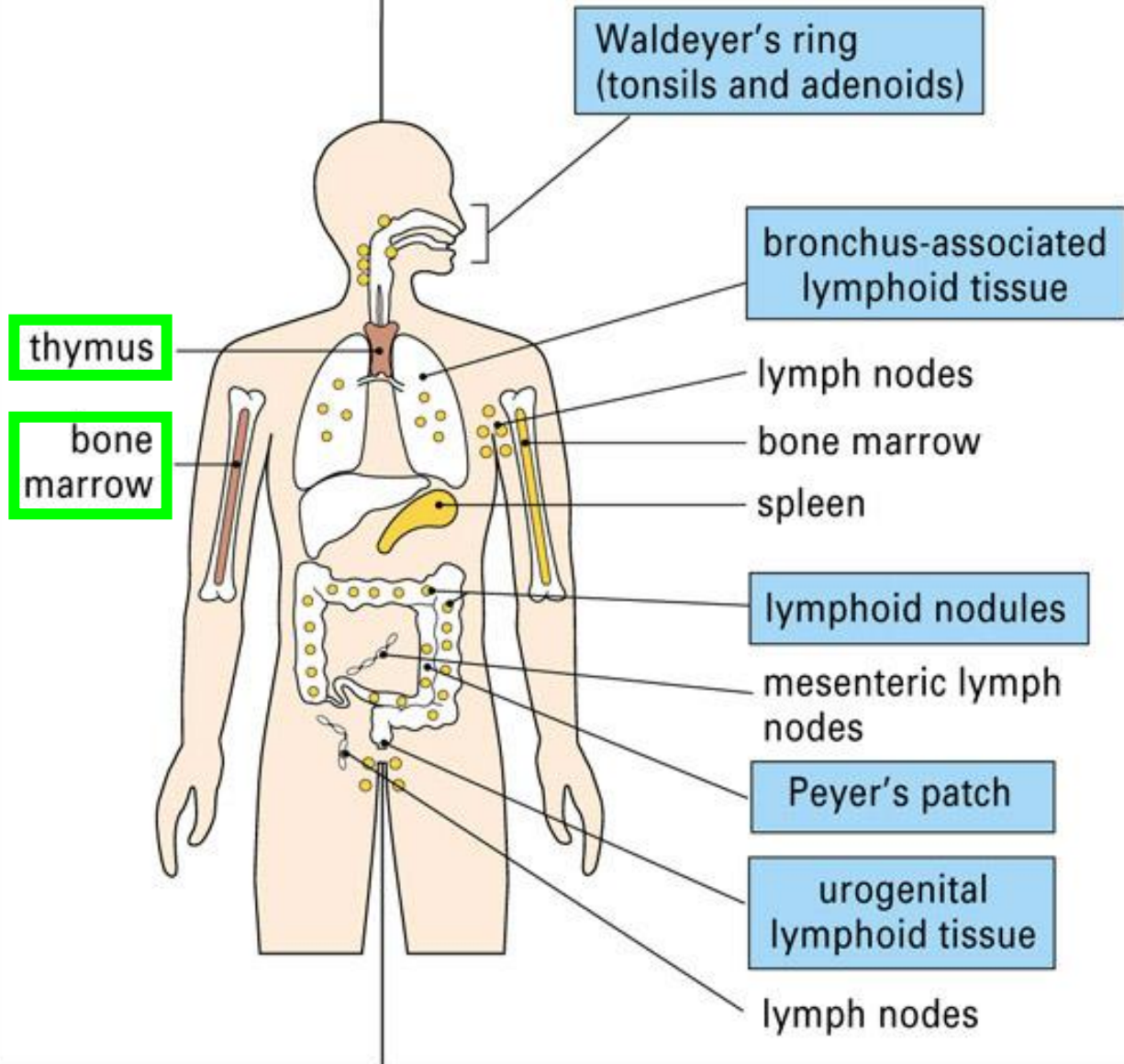
La produzione delle cellule del sangue

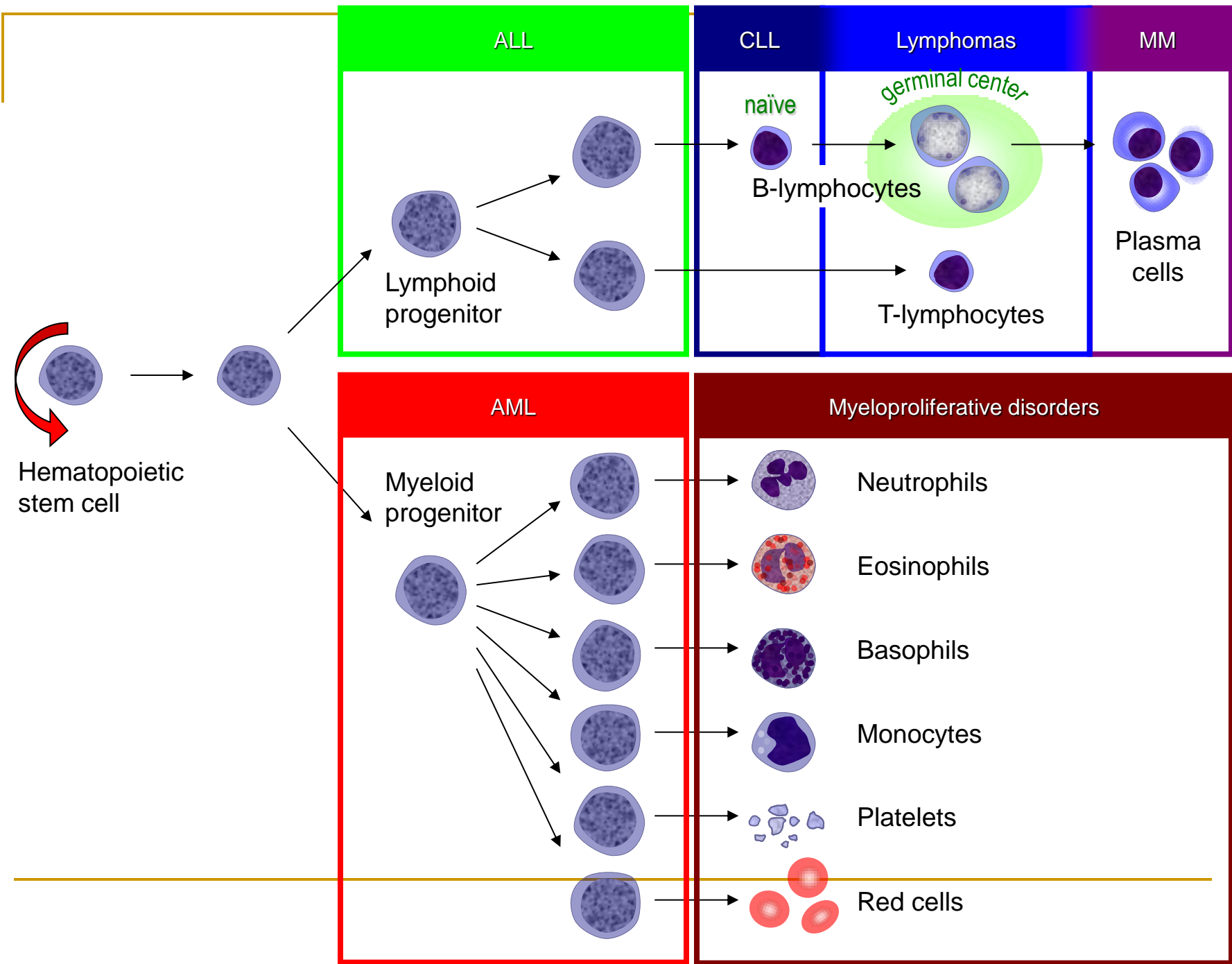
- La sede di produzione delle cellule del sangue è il midollo osseo: tutte le cellule ematiche derivano da cellule pluripotenti che hanno la capacità di moltiplicarsi.



primary lymphoid organs

secondary lymphoid organs and tissues





Markers tumorali/diagnostici nelle malattie oncoematologiche

- Markers clinici
 - Markers di laboratorio
 - Emocromo
 - Markers sierici: LDH, Beta2-microglobulina, CM sierica/urinaria
 - Markers tissutali
 - Immunoistochimica
 - Citofluorimetria
 - Markers genetici
-

Gli esami diagnostici in ematologia

Esami diagnostici

- Emocromo
 - Esami di laboratorio
 - Esami su cellule in sospensione
 - Citologia
 - Citochimica
 - Immunocitometria
 - Biologia molecolare
 - Citogenetica
 - Esame su tessuto
 - Morfologia
 - Immunoistochimica
-

Esame emocromocitometrico - 1

- Livelli di emoglobina (hb)
 - Ridotti: Leucemia, Linfoma, Mieloma,
 - Elevati: Policitemia vera, Poligl secondaria
 - Concentrazione di piastrine
 - Bassa: Leucemie e/o Mielomi, cirrosi,...
 - Elevata: Trombocitemia essenziale, processo non neoplastico, emorragia
 - Concentrazione di leucociti
 - Poco informativa – formula leucocitaria
-

Esame emocromocitometrico - 2

- Alterazioni della formula leucocitaria
 - Neutrofili
 - Bassi: infezione, leucemia, pat autoimmune, terapia
 - Elevati: infezione, sindrome mieloproliferativa
 - Linfociti
 - Bassi: infezione, terapia
 - Elevati: infiammazione, leucemia linfatica, linfocitosi policlonale
-

L'esame emocromocitometrico -3

Descr. Esame	Risultato	Unita' Mis.	Valori di Rif. e Range Terapeutico

Sg-ESAME EMOCROMOCITOMETRICO			
* LEUCOCITI	49,68	migl./ul	4,30 - 10,80
ERITROCITI			5,50 mil/ul 4,50 - 5,90
Emoglobina	15,6	g/dl	13,5 - 17,5
Ematocrito	47,8	%	39,0 - 51,0
Volume Globulare Medio	86,8	fl	80,0 - 100,0
Contenuto Emoglobinico	28,4	pg	26,0 - 34,0
Conc.Emoglobinica			32,7 % 31,0 - 37,0
Distrib.Eritrocitaria	18,8	%	11,0 14,0
PIASTRINE	245	migl./ul	150 - 400
Volume Medio Piastrinico	9,3	fl.	9,1 12,3

(Sg)Lc-FORMULA LEUCOCITARIA			
NEUTROFILI			9,8 % -
LINFOCITI	86,8	%	-
MONOCITI	1,9	%	-
EOSINOFILI	0,7	%	-
BASOFILI	0,8	%	-
Neutrofili	4,87	migl./ul	-
Linfociti	43,11	migl./ul	-
Monociti	0,97	migl./ul	-
Eosinofili	0,35	migl./ul	-
Basofili	0,39	migl./ul	-

Sg-OSSERVAZIONI MORFOLOGICHE			
STRISCIO SANGUE PERIFERICO	Esame sottoposto ad approfondimento.		
	Al microscopio ottico si confermano i dati strumentali.		
GLOBULI BIANCHI:	Numerose ombre linfocitarie		

L'esame emocromocitometrico -4

Sg-ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

LEUCOCITI	7,79	migl./ul	4,30 - 10,80
ERITROCITI	4,61	mil/ul	4,00 - 5,20
Emoglobina	14,6	g/dl	12,0 - 16,0
Ematocrito	42,8	%	35,0 - 47,0
Volume Globulare Medio	92,9	fl	79,0 - 98,0
Contenuto Emoglobinico	31,6	pg	26,0 - 34,0
Conc.Emoglobinica	34,0	%	31,0 - 37,0
Distrib.Eritrocitaria	15,0	%	11,0 14,0
PIASTRINE	269	migl./ul	150 - 400
Volume Medio Piastrinico	9,8	fl.	9,1 12,3

(Sg)Lc-FORMULA LEUCOCITARIA

NEUTROFILI	43,6	%	-
LINFOCITI	48,8	%	-
MONOCITI	4,5	%	-
EOSINOFILI	2,6	%	-
BASOFILI	0,4	%	-
Neutrofili	3,39	migl./ul	-
Linfociti	3,80	migl./ul	-
Monociti	0,35	migl./ul	-
Eosinofili	0,20	migl./ul	-
Basofili	0,03	migl./ul	-

Sg-OSSERVAZIONI MORFOLOGICHE

STRISCIO SANGUE PERIFERICO Esame sottoposto ad approfondimento.

Al microscopio ottico si confermano i dati
strumentali.

GLOBULI BIANCHI: Si osservano ombre linfocitarie

Monoclonal B lymphocytes*

<5000/microliter

>5000/microliter

Lymphadenopathy
Spleen / liver enlargement
Cytopenias related to BM infiltration

No

Yes

MBL

SLL

CLL

* Smlg weak, CD5+, CD19+, CD23+, CD20 weak

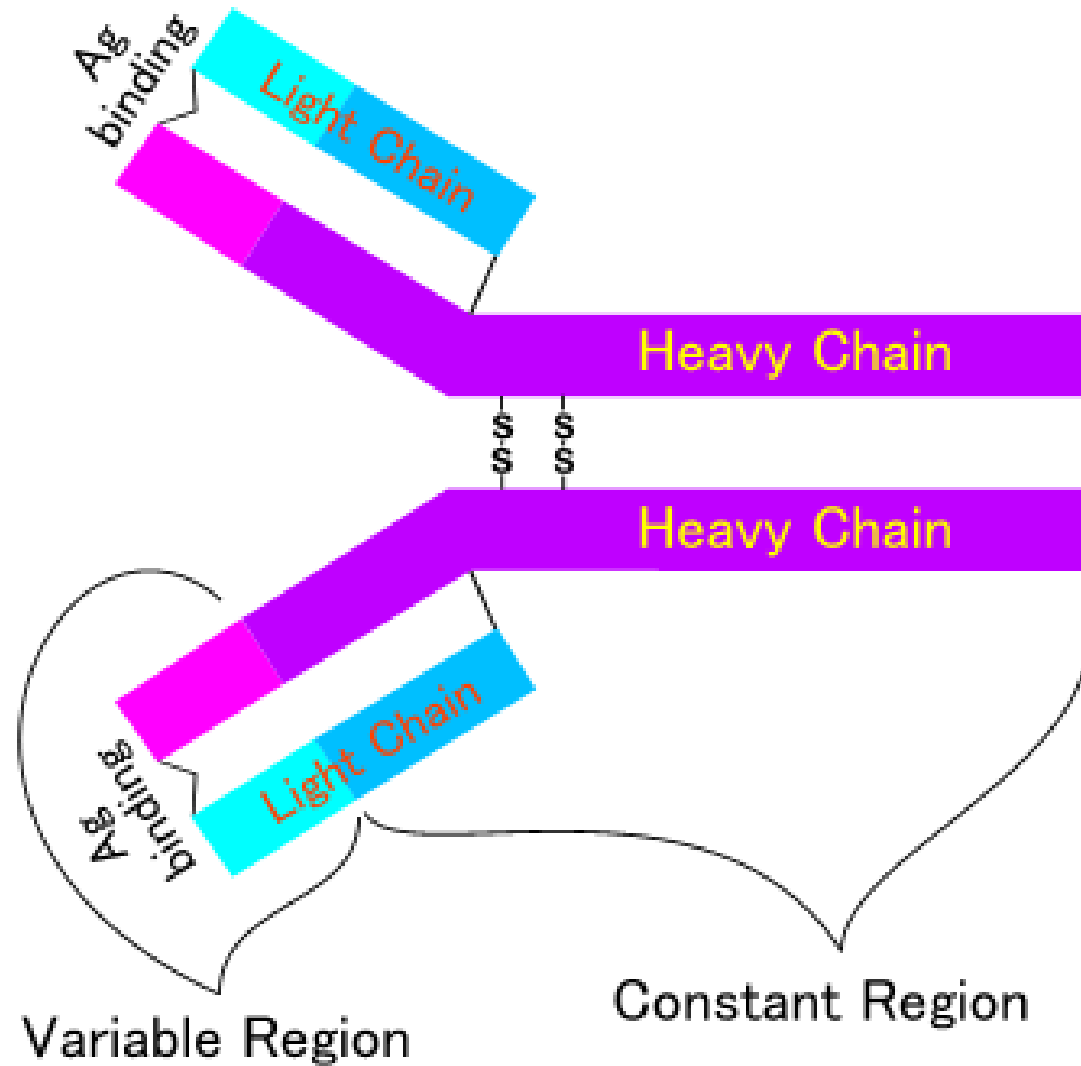
BM, bone marrow; CLL, chronic lymphocytic leukemia; MBL, monoclonal B-cell lymphocytosis; SLL, small lymphocytic leukemia

IWCLL: Hallek M, et al. *Blood*. 2008;111(12):5448-5456. WHO: Müller-Hermelink HK, et al. In: Swerdlow S, et al, eds. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.

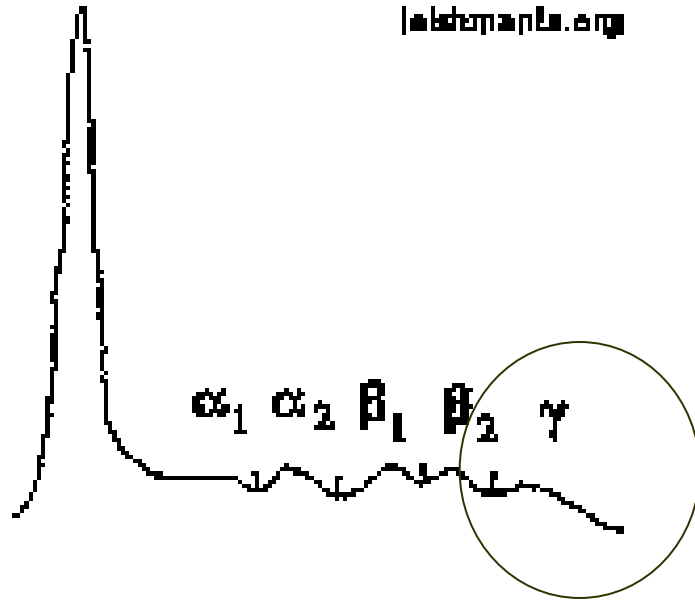
Esami di laboratorio

- LDH, Uricemia, Beta2 microglobulina
 - Scarso significato diagnostico, Utili per la prognosi
 - Studio delle proteine sieriche e urinarie
 - Importante significato diagnostico (Patologie plasmacellulari MM/MGUS)
-

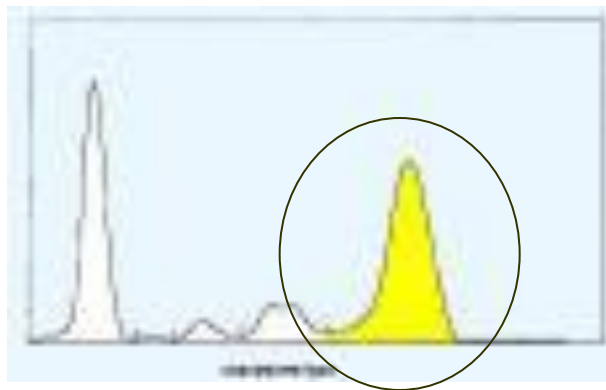
IMMUNOGLOBULINA



labdumanla.org



**Elettroforesi delle
proteine sieriche
normale**



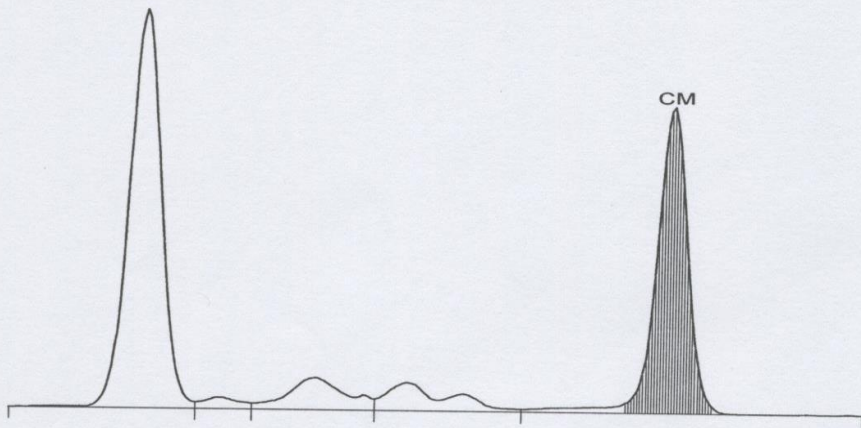
**Mieloma (picco
monoclonale in
zona gamma)**

158

21/03/2006

03213115

AMBUL.LACC



Elettroforesi delle Sieroproteine

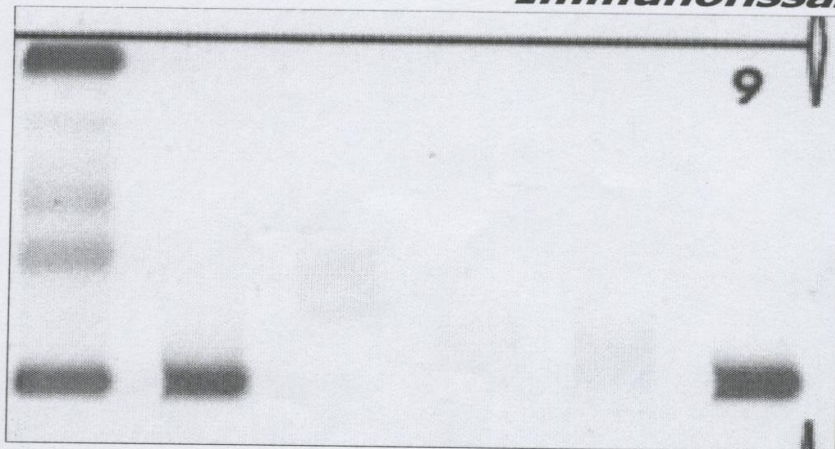
Frazioni	%		Int. rif. %	g/dl
Albumina	45,9	L	54,0 - 70,0	4,22
Alfa 1	1,7	L	1,8 - 3,4	0,16
Alfa 2	7,5	L	8,2 - 13,0	0,69
Beta	6,9	L	8,0 - 14,5	0,63
Gamma	38,0	H	9,0 - 19,0	3,50
CM	36,2			3,33

RAPP.A/G 0,85

P.T 9,2 g/dl

PICCO IN ZONA GAMMA-GLOBULINE. DOSAGGIO DELLA COMPONENTE MONOCLONALE (C.M) PER VIA DENSITOMETRICA

Immunofissazione / Siero



ELP G A M K L
GAMMAPATIA MONOCLONALE IgG TIPO LAMBDA.

MGUS, Mieloma multiplo e altre condizione: diagnosi differenziale

Variabile	MGUS	Mieloma smouldering	Mieloma multiplo	Macroglobulinemia di Waldenström	Amiloidosi primaria
plasmacellule midollari (%)	<10	≥10	≥10	>10 (cellule linfoplasmocitoidi)	<10
proteina monoclonale circolante (g/dL)	e <3	e/o ≥3	e/o ≥3	e >3	e <3
manifestazioni cliniche	assenti	assenti	presenti*	presenti*	presenti*

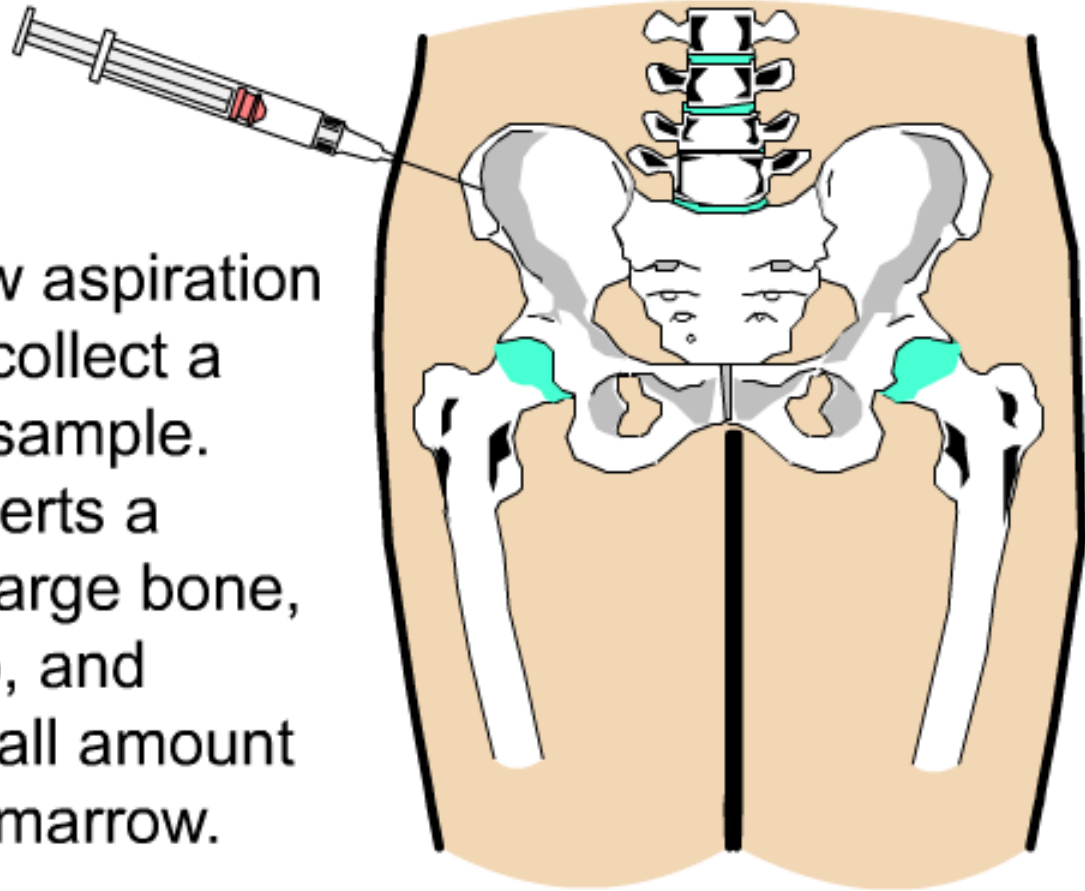
**segni clinici presenti secondo la patologia di base*

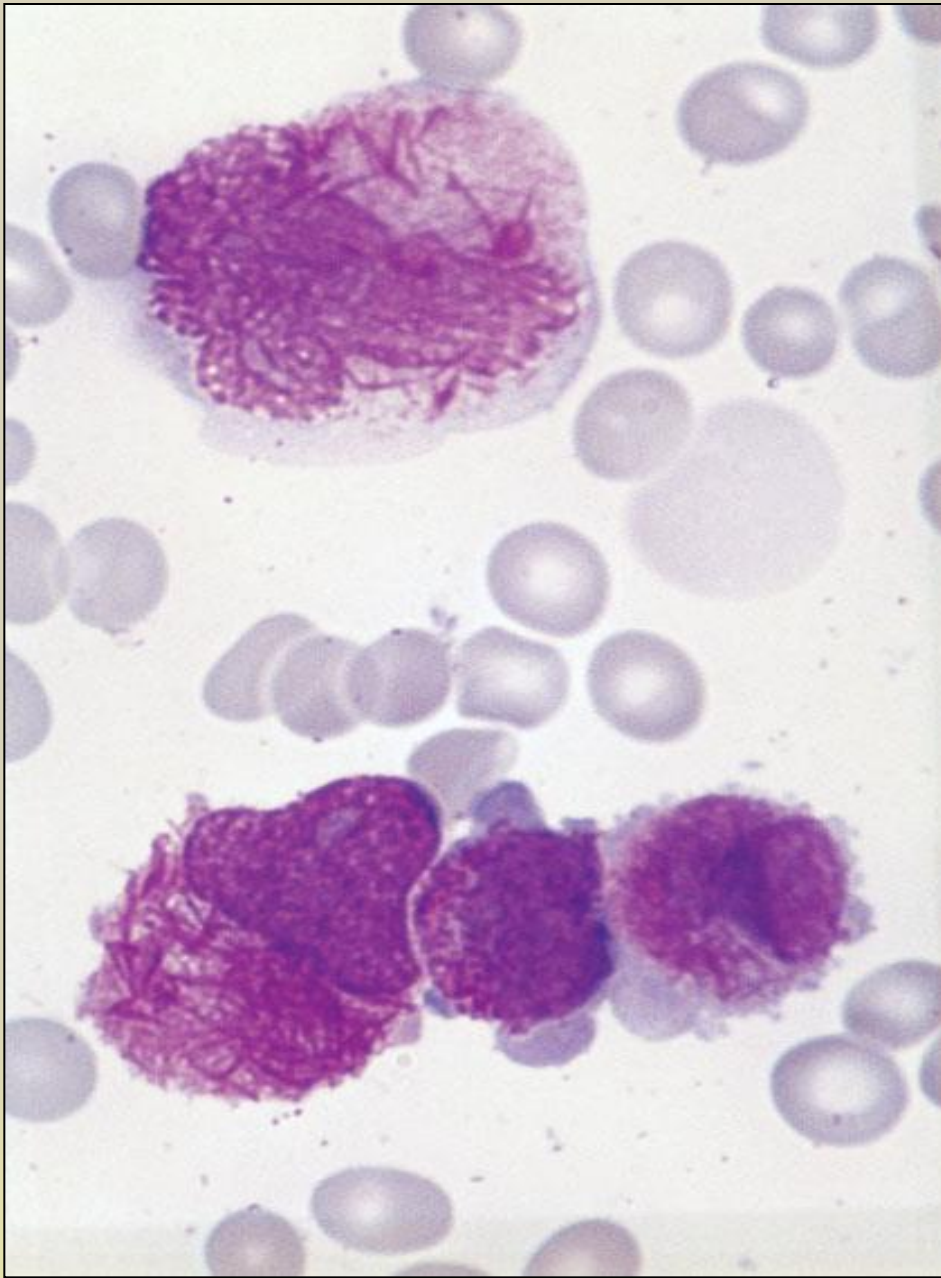
Esame di cellule in sospensione

- Più fonti di cellule
 - Sangue periferico o midollare
 - Liquidi biologici (ascite, vers. Pleurico, liquor...)
 - Tessuti processati (tripsina)
 - Più modalità di esame
 - Citologia
 - Citochimica
 - Immunocitometria
 - Biologia molecolare
 - Citogenoetica
-

L'aspirato midollare

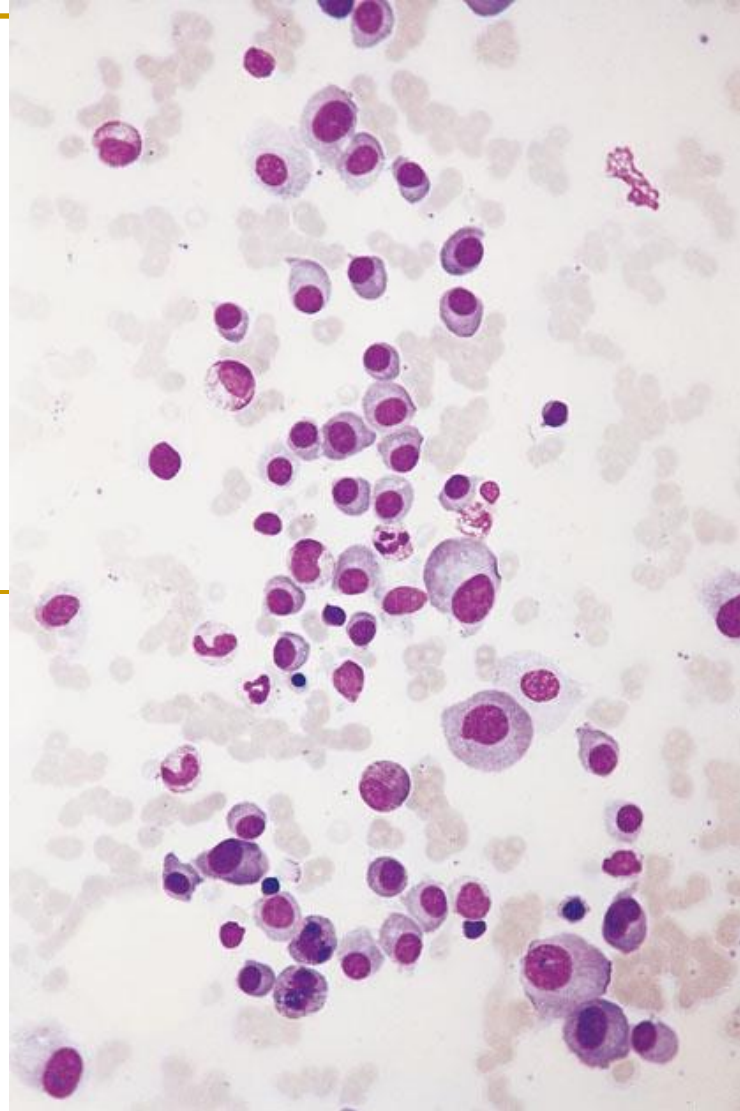
A bone marrow aspiration is one way to collect a bone marrow sample. The doctor inserts a needle into a large bone, usually the hip, and removes a small amount of liquid bone marrow.





**Leucemia Mieloide
Acuta: sottotipo M₃**

MM - CITOLOGIA



Valutazioni citologiche

- Consente di eseguire valutazioni citochimiche
 - Fosfatasi alcalina leucocitaria
 - PAS
 - MPO
 - ...
 - Adatto per studi di immunocitochimica, immunofluorescenza
 - Permette analisi molecolari/citogenetiche
-

LMA

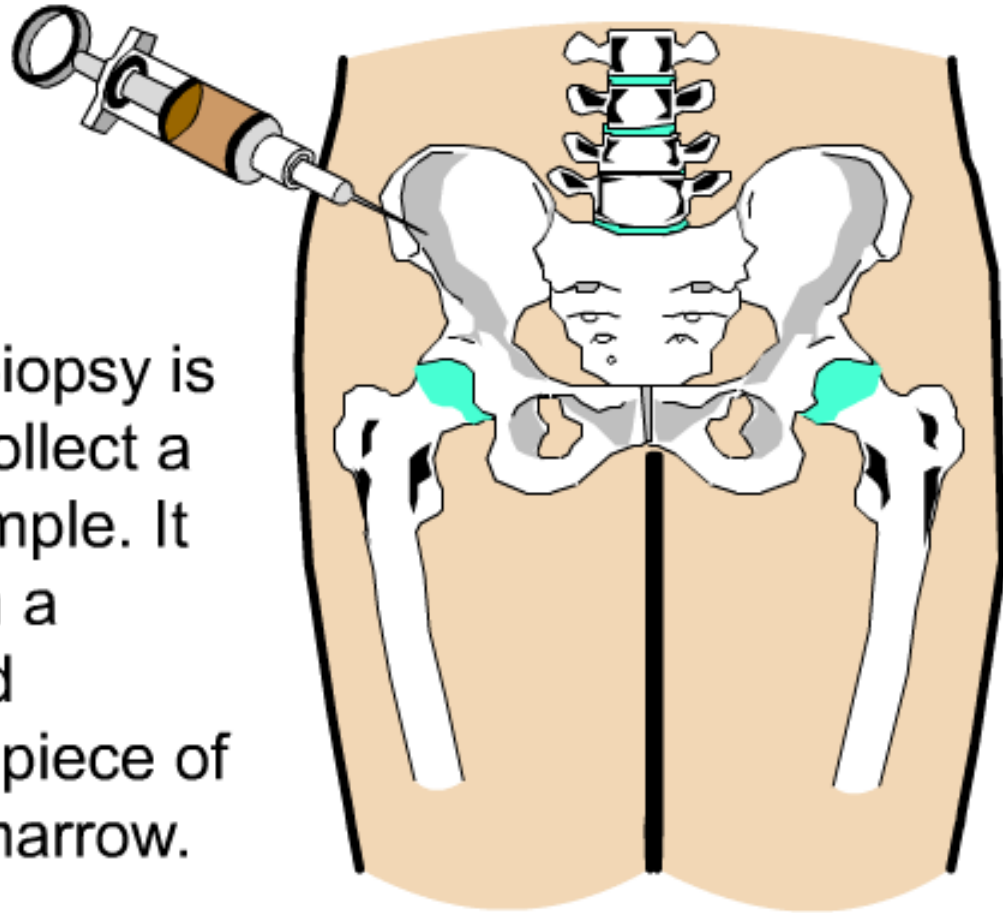
Varietà FAB	Morfologia midollare	Citochimica
M1	mieloblasti >90%	❖ mieloperossidasi positiva ❖ Sudan B positivo
M2	mieloblasti <90%	❖ mieloperossidasi positiva ❖ Sudan B positivo ❖ esterasi positive NaF resistenti
M3	blasti ipergranulati con corpi di Auer	❖ mieloperossidasi positiva ❖ Sudan B positivo
M3v	blasti con fini granuli bi- o plurilobati	❖ mieloperossidasi positiva ❖ Sudan B positivo
M4	mieloblasti <80% monoblasti >20%	❖ mieloperossidasi positiva ❖ Sudan B positivo ❖ esterasi positive NaF resistenti e inibite
M5a	monoblasti >80%	esterasi positive NaF inibite
M5b	❖ monoblasti ❖ promonoblasti ❖ monoditi	esterasi positive NaF inibite
M6	❖ eritroblasti >50% ❖ mieloblasti >30%	❖ PAS positività ❖ mieloperossidasi positiva ❖ Sudan B positivo
M7	❖ blasti di tipo linfoide >30% ❖ mielofibrasi	perossidasi piastrinica positiva

Esame di tessuti

- Esame Istologico
 - Linfo nodo, organo EN, BOM,
 - Esame Immunoistochimico
 - Sangue periferico o midollare, sospensioni cellulari da liquidi o versamenti
 - Valutazioni molecolari e citogenetiche su tessuto
-

Modalità diagnostica-2

A bone marrow biopsy is another way to collect a bone marrow sample. It is performed with a larger needle and removes a small piece of bone and bone marrow.



I markers diagnostici delle malattia oncoematologiche

- Markers immunologici
 - Markers genetici
-

Markers immunologici

- Ricerca l'espressione di particolari antigeni sulle cellule/tessuto
 - Marcatori di tessuto
 - Marcatori di patologia (espressioni aberranti)
 - Marcatori di clonalità (solo m. linfoprolif.),
 - Eseguibile su
 - cellule in sospensione → citofluorimetria
 - Tessuto → immunohistochimica
-

Table 1: Antigens frequently analyzed in the immunophenotyping of hematopoietic malignancies

Antigens with broad expression	
Panmyeloid antigens	CD13, CD33, CDw65, MPO
Pan-B-cell antigens	cyCD22, CD19, cyCD79a
Pan-T-cell antigens	cyCD3, CD2, CD7, CD5
Antigens associated with immaturity or activation	
Immaturity	TdT, CD34, HLA-DR ^a
Antigens with lineage specific and maturation dependent expression	
Myeloid cells	CD14, CD15, glycophorin A, CD41, CD61
B-cells	CD20, CD23, FMC7, cylgμ, slg
T-cells	CD1a, CD4, CD8
NK cells ^b	CD16, CD56, CD57

^aconstitutive expression on monocytes and B-cells, ^bin absence of CD3
 cy cytoplasmic, slg surface membrane immunoglobulins

Myeloid-cell development

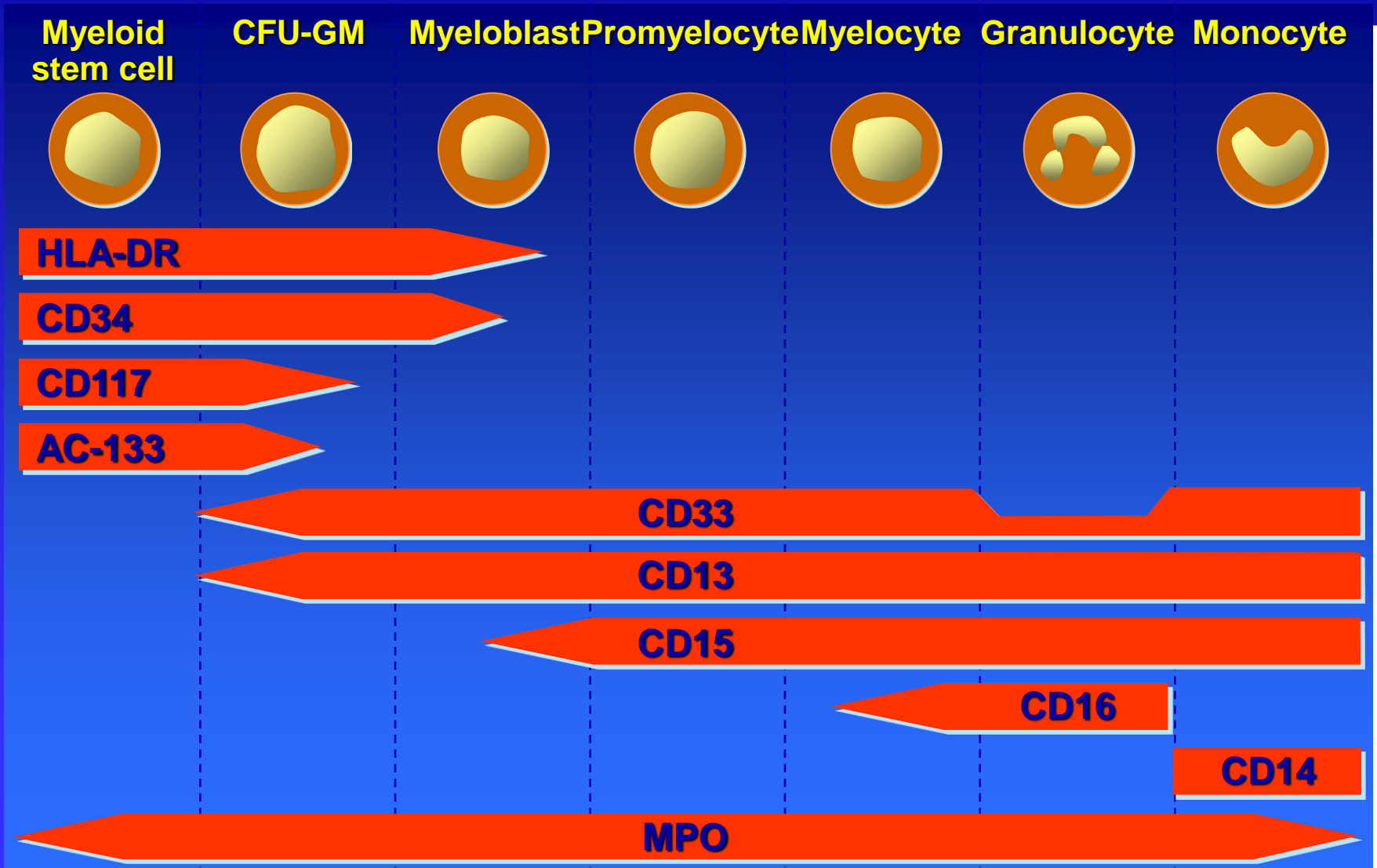
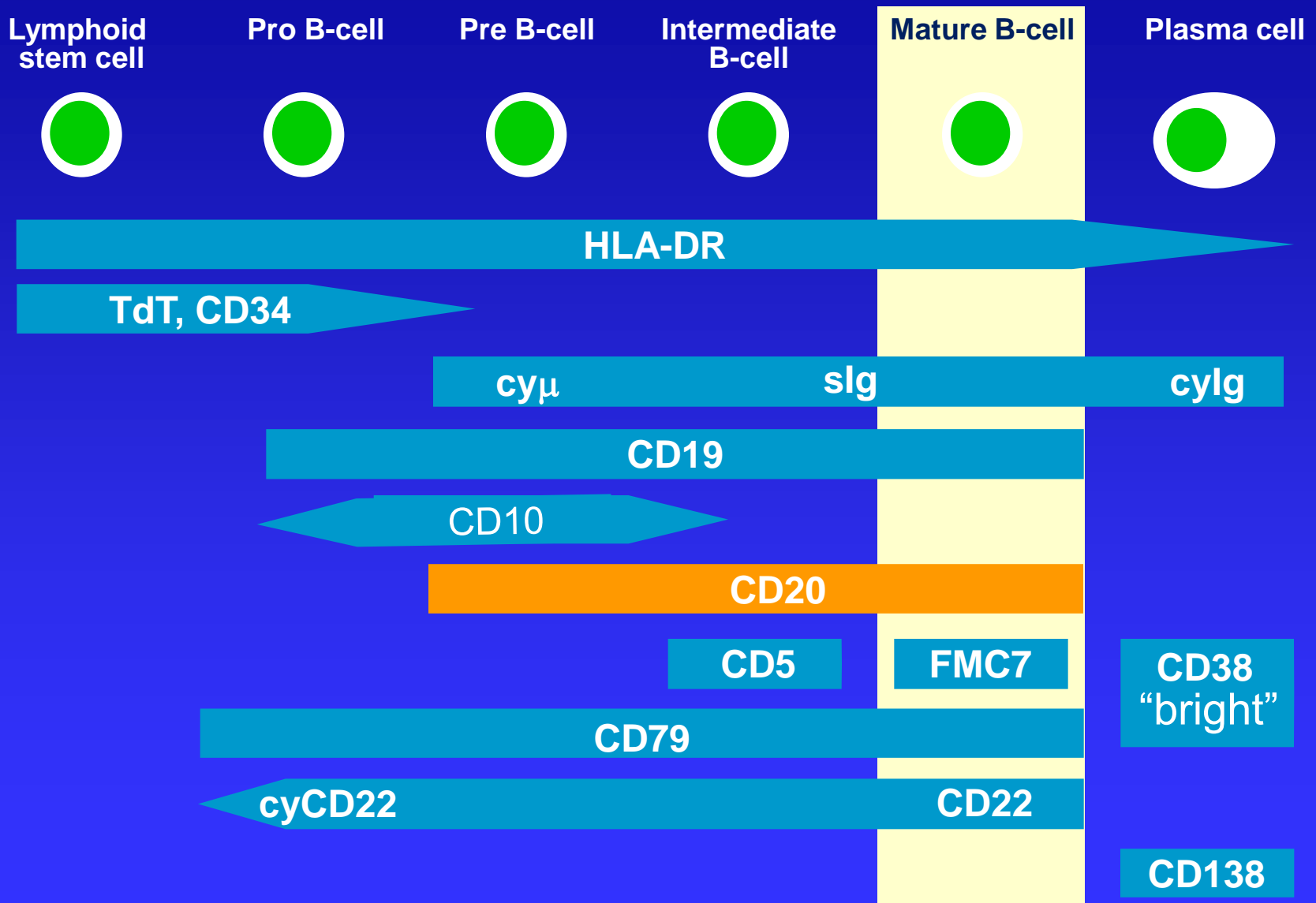


Table 7: Immunological characteristics in acute myeloid leukemia

Antigen	FAB classification						
	M0	M2 t(8;21)	M3 t(15;17)	M4Eo Inv16	M5	M5 t(9;11)	M7
MPO	+/-	+	+	+	-/+	-	-
CD2	-			+/-			
CD13	+/-	+	+	+	+/-	-	+/-
CD14	-	-	-	+/-	+/-	-	-
CD15	-	+/-	-/+	+/-		+	-
CD19	-	+/-					
CD33	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-
CD34	+/-	+/-	-	-/+			
CD56		+/-					
CD61	-	-	-	-	-	-	+
CD64	-	-	+/-	+	+	+	
CDw65	-/+	+/-	-/+	+	+/-	+	+/-
CD117	+/-	+/-	-/+	+/-	-/+		
HLA-DR	+/-	+	-	+	+	+	+/-

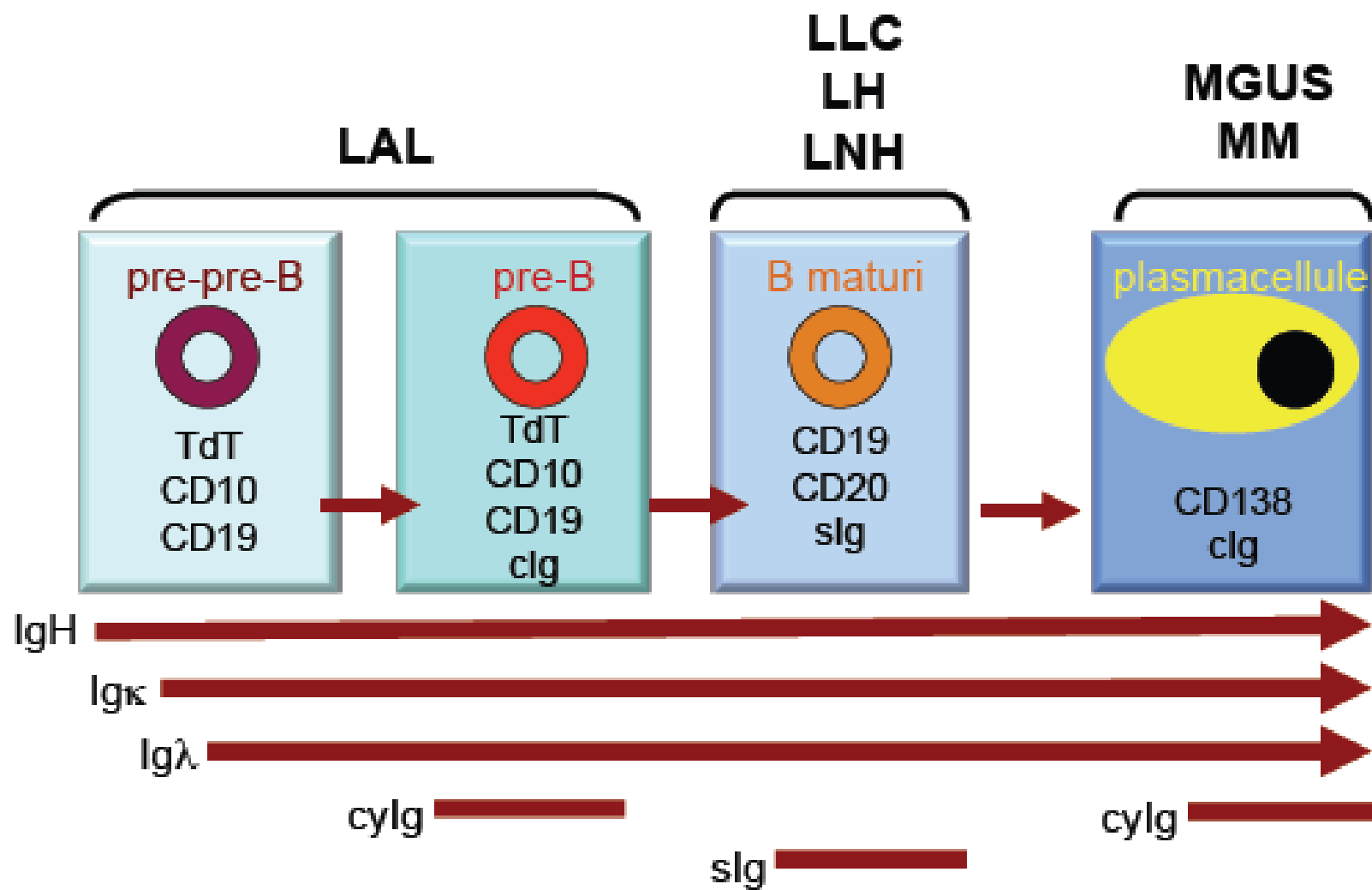
-: Antigen not expressed, -/+: antigen expressed in less than 50 % of patients, +/- antigen expressed in majority of patients, +: antigen expressed, open fields represent partial expression without specificity for diagnosis or lack of reliable data

B- cell development

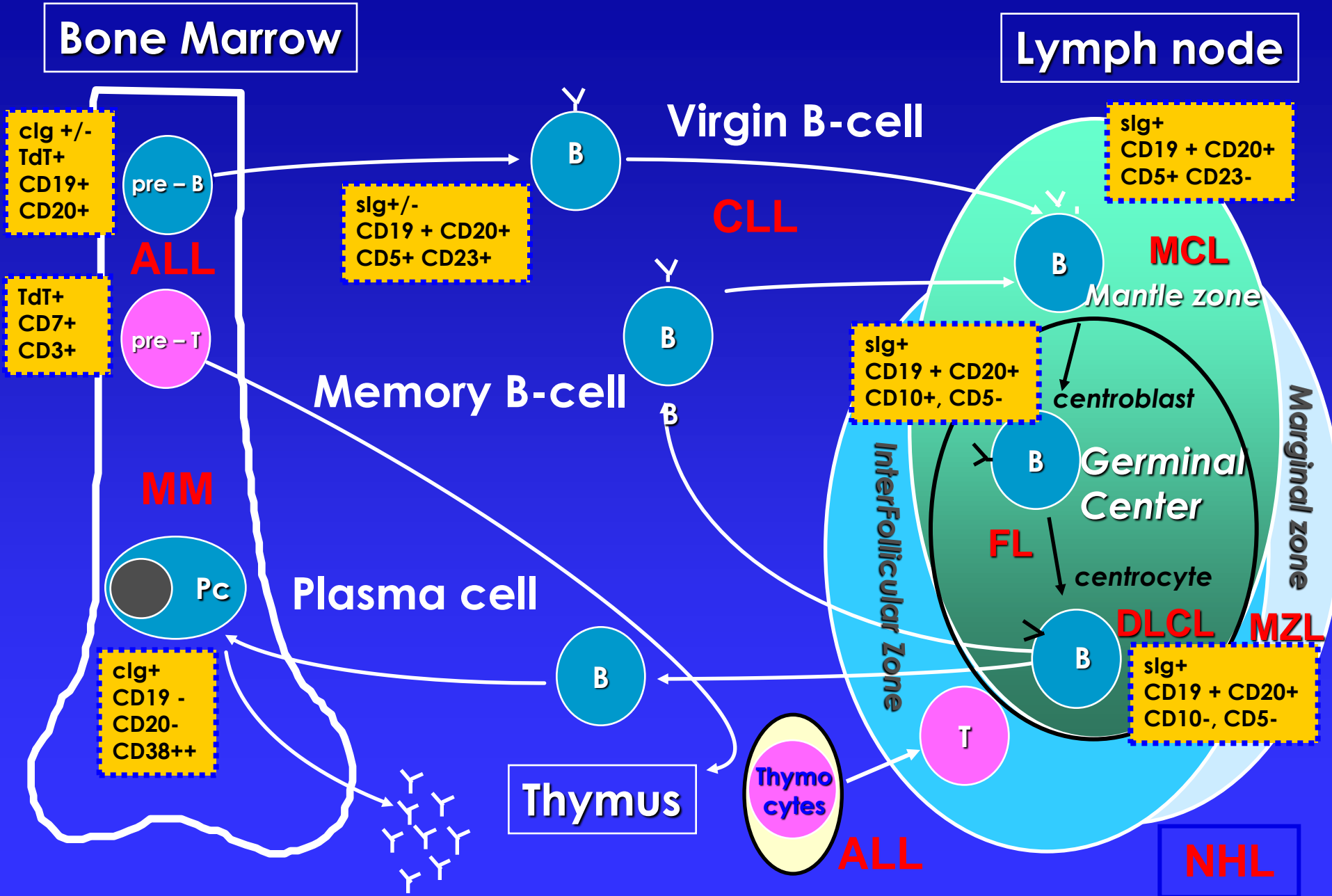


Neoplasie linfoidi B

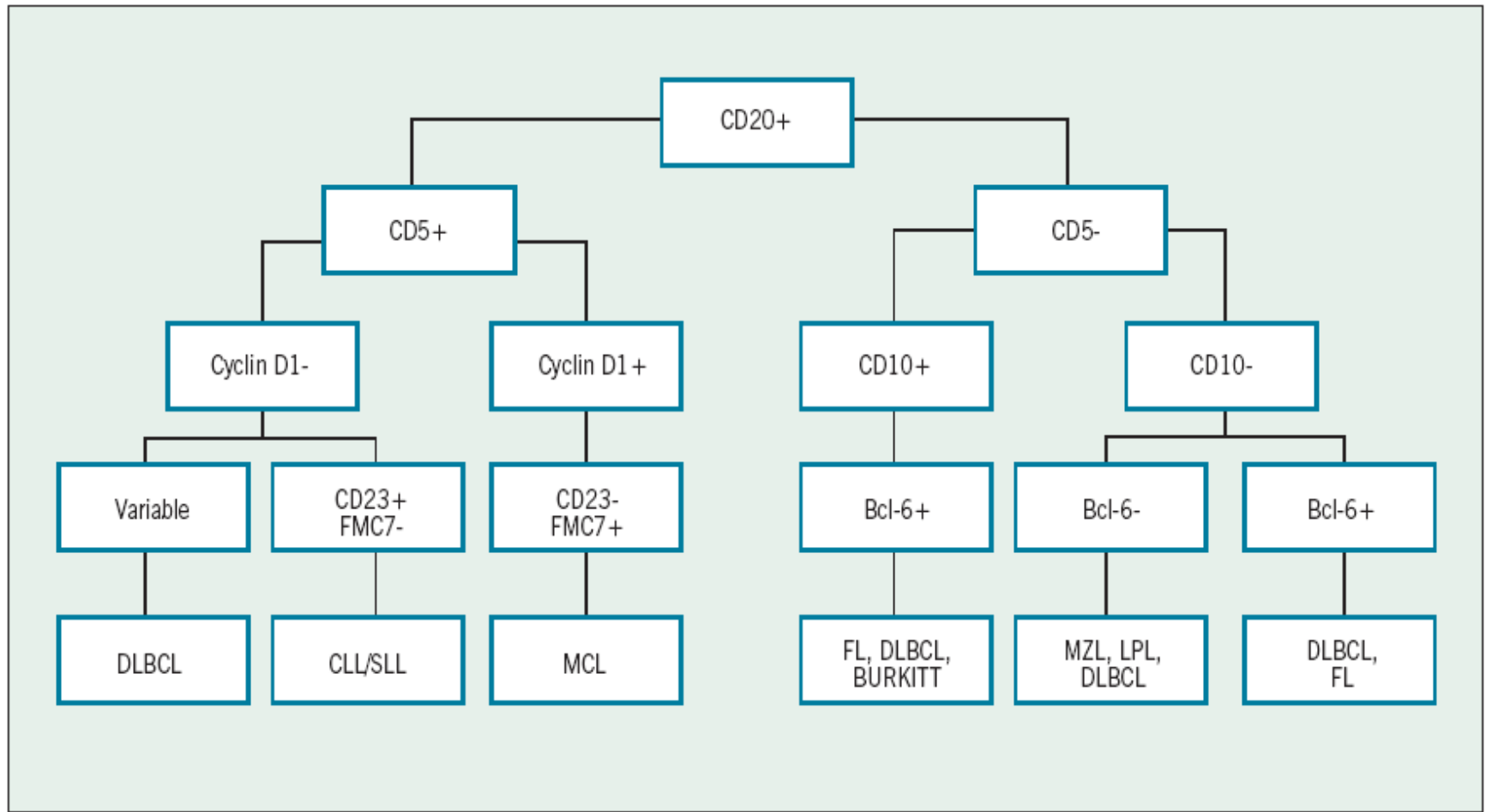
Dal linfoblasto alla plasmacellula



B/T-cell Differentiation Pathway and Malignant Counterparts



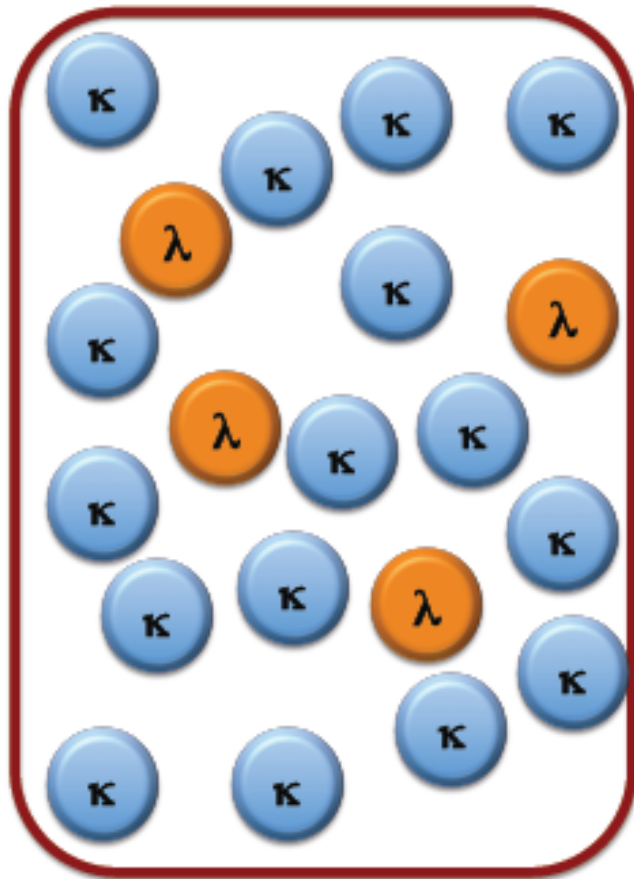
Panel immunoistochimico Linfomi



CFM per lo studio della clonalità

Neoplasie linfoidi B

Restrizione clonale nella dx citofluorimetrica/IHC (i)

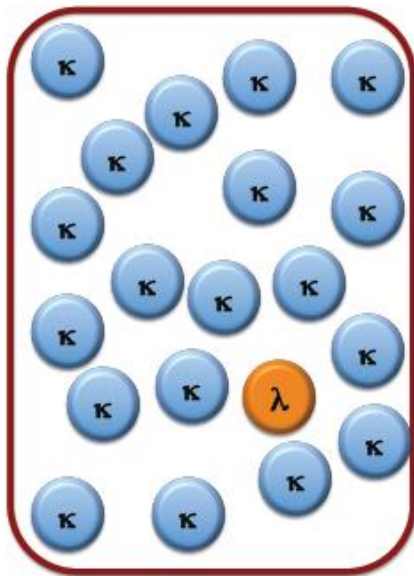


Condizioni normali

κ 80%

λ 20%

CFM per lo studio della clonalità

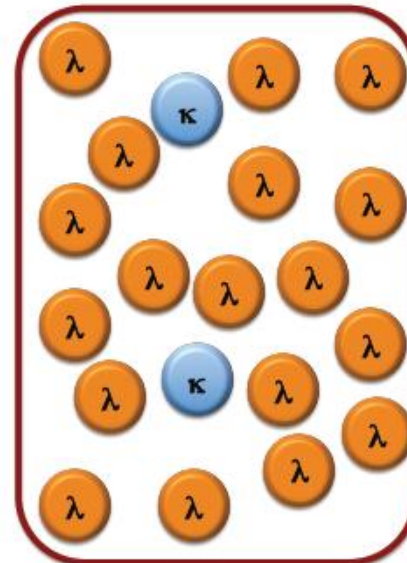


Restrizione clonale κ

κ 95%

λ 5%

MONOCLONALITA'



Restrizione clonale λ

κ 10%

λ 90%

MONOCLONALITA'

IMMUNOISTOCHIMICA

Marker(s)	Tipo cellulare
(A) Pannello minimo	
CD34 ^a	Blasti, cellule progenitrici, cellule endoteliali
CD31 o CD42 o CD62	Megacariociti
Triptasi ^a	Mast-cellule, basofili, progenitori mieloidi
(B) Pannello ampliato—in base alle linee cellulari da ricercare	
CD3	Cellule T
CD15 ^b	Monociti, granulociti
CD20	Cellule B
CD25	Cellule T e B cell, mast-cellule atipiche
CD38	Plasmacellule
CD68, CD68R ^b	Monociti, macrofagi, cellule mieloidi
Lisozime ^b	Monociti, macrofagi
CD117 ^a	Cellule progenitrici, mast-cellule
2D7, BB1	Basofili

a In una piccola percentuale di casi di MDS, i blasti possono essere CD34-. In questi casi si può impiegare come alternativa il CD117, mentre la triptasi solitamente è negativa o debolmente positiva nei blasti.

b I markers dei monociti/macrofagi possono essere utili per distinguere i monociti immaturi e i blasti (CMML versus LMA). Diversamente essi non sono raccomandati per la diagnosi di MDS.

CFM su sangue periferico

POPOLAZIONE ANALIZZATA	regione di linfociti	
Conta dei G.B.	7,93 x10e3/micr	
linfociti valore assoluto	3930 n/microl	
CD 03 (T linfociti) %	76,00 %	60,00 - 87,00
CD 03 (T linfociti) V.A.	2986,80 n/micr	860,00 - 2607,0
CD 03+ CD 04+ (T helper) %	44,00 %	32,00 - 61,00
CD 03+ CD 04+ V.A. (T helper)	1729 n/microl	493 - 1666
CD 03+ CD 08+ (T citotoss.) %	38,00 %	14,00 - 43,00
CD 03+ CD 08+ V.A. (T citotossici)	1493,40 n/microl	222,00 - 1112,0
CD 03- CD 08+ % (LGL)	3,00 %	2,00 - 16,00
CD 04+ CD 08+ (T immaturi)	7,00 %	
CD 03+ CD 16/56+	22,00 %	
CD 03- CD 16/56+ (linf. NK)	5,00 %	
CD 03- CD 16/56+ V.A.	196,50 n/microl	
CD 10	Negativo	
CD 19 (B Linfociti)	14,00 %	5,00 - 20,00
CD 19 V.A.	550,20 n/microl	
CD 38	17,00 %	
CD 20	14,00 %	a bassa densità sulla popolazione clonale
CD 05+ CD 19+	8,00 %	
CD 05+ CD 19-	72,00 %	
CD 22	8,00 %	
CD 23	9,00 %	
FMC7	1,00 %	
CD 79b	5,00 %	
CD 19+ CD 38+ (% sui B linfociti)	Negativo	
CD 19+CD5+ CD49d+	4,0 %	
CD 19+ S-cat K (% sul tot B linfociti)	21,00	
CD 19+ S-Cat L (% sul tot B linfociti)	76,00	

CFM su sangue periferico

Conta dei G.B.	10,95 x10e3/micr	
linfociti valore assoluto	2020 n/microl	
CD 45 dim a basso SSC	1,0 %	
area dei precursori B, linfoblasti, linfociti atipici.		
CD 45 bright a basso SSC	88,0 %	
area dei linfociti.		
CD 45 negativi	2,00 %	
area degli eritroblasti, piastrine, stromi.		
CD 03 (T linfociti) %	63,00 %	60,00 - 87,00
CD 03 (T linfociti) V.A.	1272,60 n/micr	860,00 - 2607,0
CD 03+ CD 04+ (T helper) %	33,00 %	32,00 - 61,00
CD 03+ CD 04+ V.A.	667 n/microl	493 - 1666
(T helper)		
CD 03+ CD 08+ (T citotoss.) %	23,00 %	14,00 - 43,00
CD 03+ CD 08+ V.A.	464,60 n/microl	222,00 - 1112,0
(T citotossici)		
CD 03- CD 08+ % (LGL)	2,00 %	2,00 - 16,00
CD 04+ CD 08+ (T immaturi)	0,40 %	
CD 03+ CD 16/56+	13,00 %	
CD 03- CD 16/56+ (linf. NK)	9,00 %	
CD 03- CD 16/56+ V.A.	181,80 n/microl	
CD 10	13,00 %	
* CD 19 (B Linfociti)	27,00 %	5,00 - 20,00
CD 19 V.A.	545,40 n/microl	
CD 05+ CD 19+	2,00 %	
CD 05+ CD 19-	55,00 %	
CD 19+ S-cat K	75,00	
(% sul tot B linfociti)	ad alta intensit sulla popolazione patologica	
CD 19+ S-Cat L	11,00	
(% sul tot B linfociti)		

Markers genetici

- Alterazioni cromosomiche
 - Traslocazioni
 - Delezioni
 - Duplicazioni
- Alterazioni genetiche
 - Amplificazioni
 - Delezioni
 - Mutazioni
 - Fusioni

Le alterazioni geniche sono altamente specifiche e possono essere usate come veri marcatori diagnostici

Markers genetici nelle malattie ematologiche

■ M. Mieloproliferative

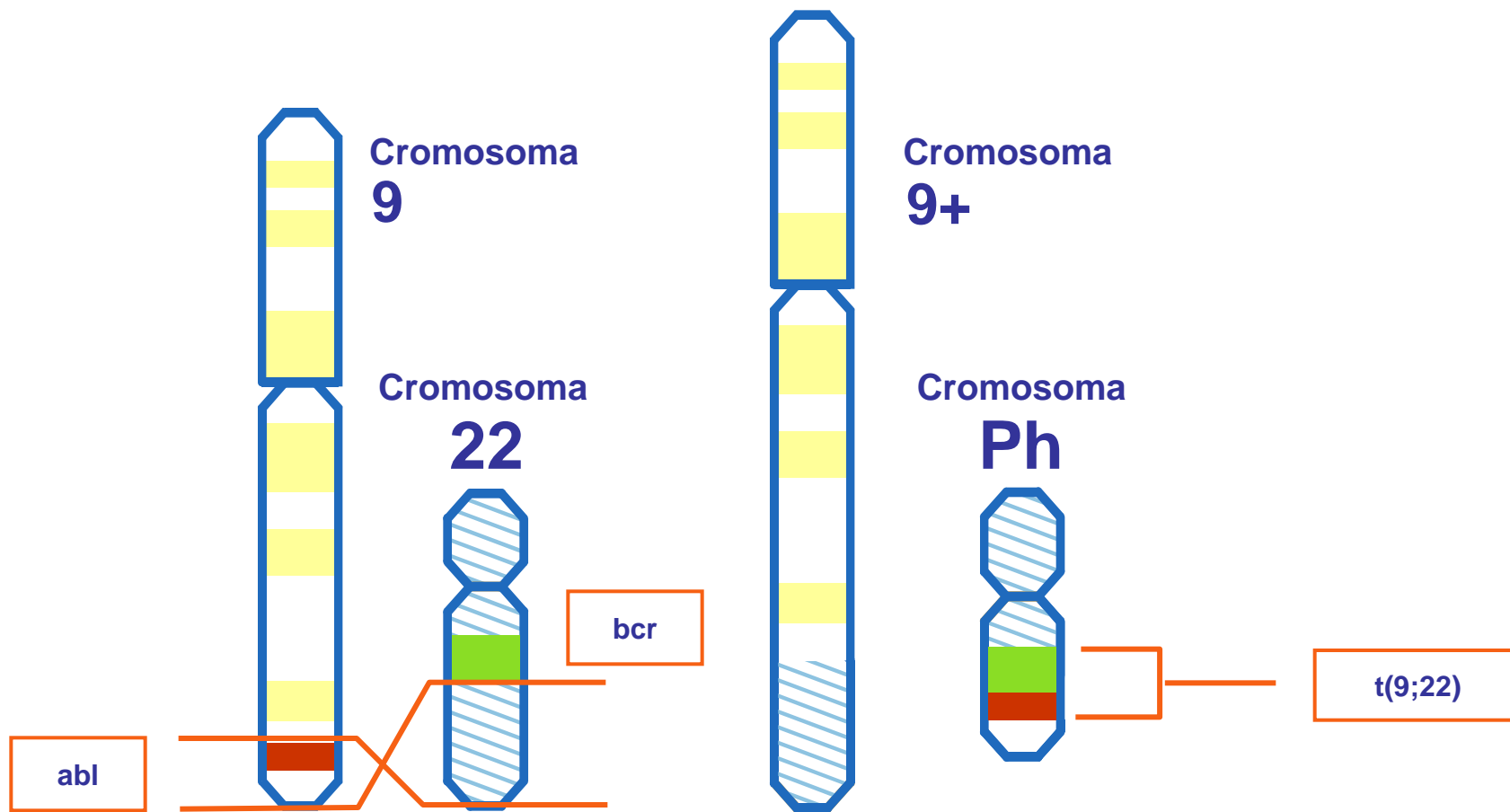
- Sono frequenti le traslocazioni cromosomiche che determinano la formazione di geni di fusione (BCR-abl, AML-ETO, PML-rar-alfa,...)
- Ruolo meno importante per le mutazioni

■ M. Linfoproliferative

- Riarrangiamento dei geni delle Ig
- Frequenti le traslocazioni che coinvolgono i geni delle immunoglobuline (amplificazione genica; t(14;18), t(11;14), t(8;14), etc...)
- Frequenti le mutazioni geniche (Bcl6)
- Alcuni esempi di geni di fusione (NPM-ALK)

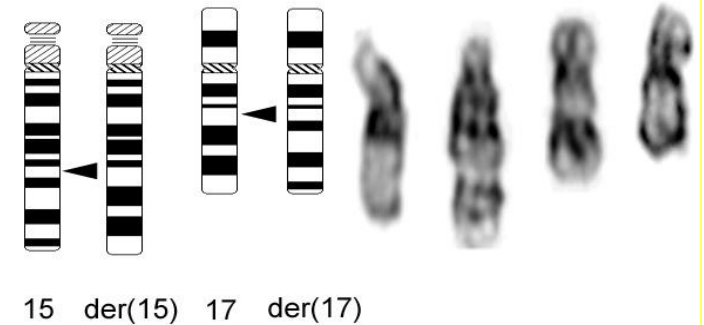
1984: la scoperta della traslocazione t(9;22)

La traslocazione t (9;22)



Nella Leucemia promielocitica, FAB M3 APL, la traslocazione **t(15;17)** coinvolge il gene che codifica per il recettore nucleare α 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.

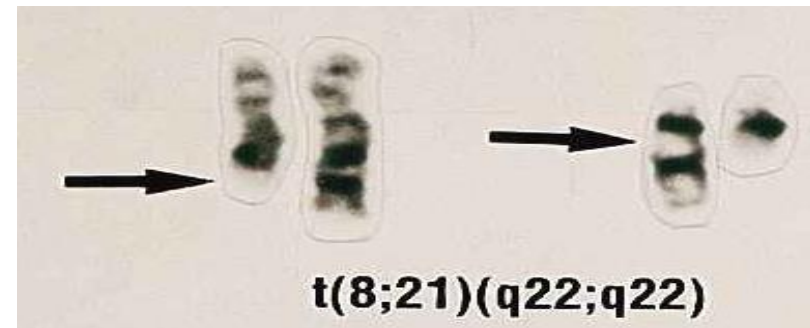
t(15;17)(q22;q11)



Varianti:

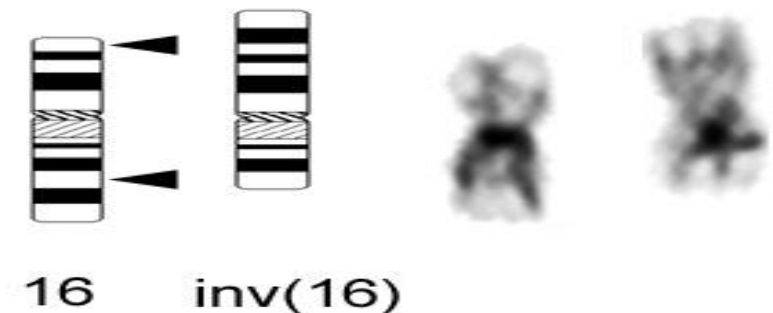
t(11;17)(q23;q22) PLZF-RAR α ; t(5;17)(q35;q21) NPM-RAR α ;
t(11;17)(q13;q21) NuMA-RAR α ; t(17;17)(q11;q21) STAT5b-RAR α ;

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



inv(16)(p13q22)

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



CITOGENETICA AVANZATA

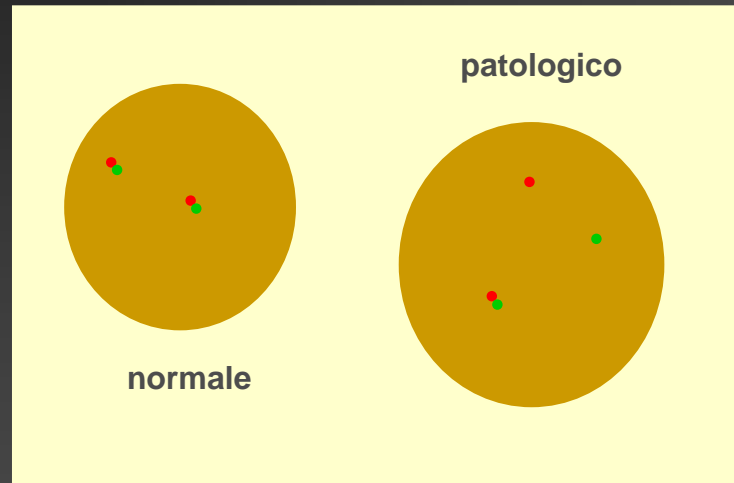
FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

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

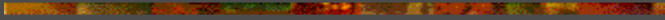


M-FISH/SKY: multiplex fish, con uso di 24 sonde colorate per tutti i cromosomi e assegnazione di un colore per ciascun cromosoma utile per l'analisi di alterazioni cromosomiche complesse. Individuati o ridefiniti riarrangiamenti cromosomici in almeno il 50% di LMA/LLA

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 immunisto chimica 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 addizionali della diagnosi differenziale dei linfomi B.

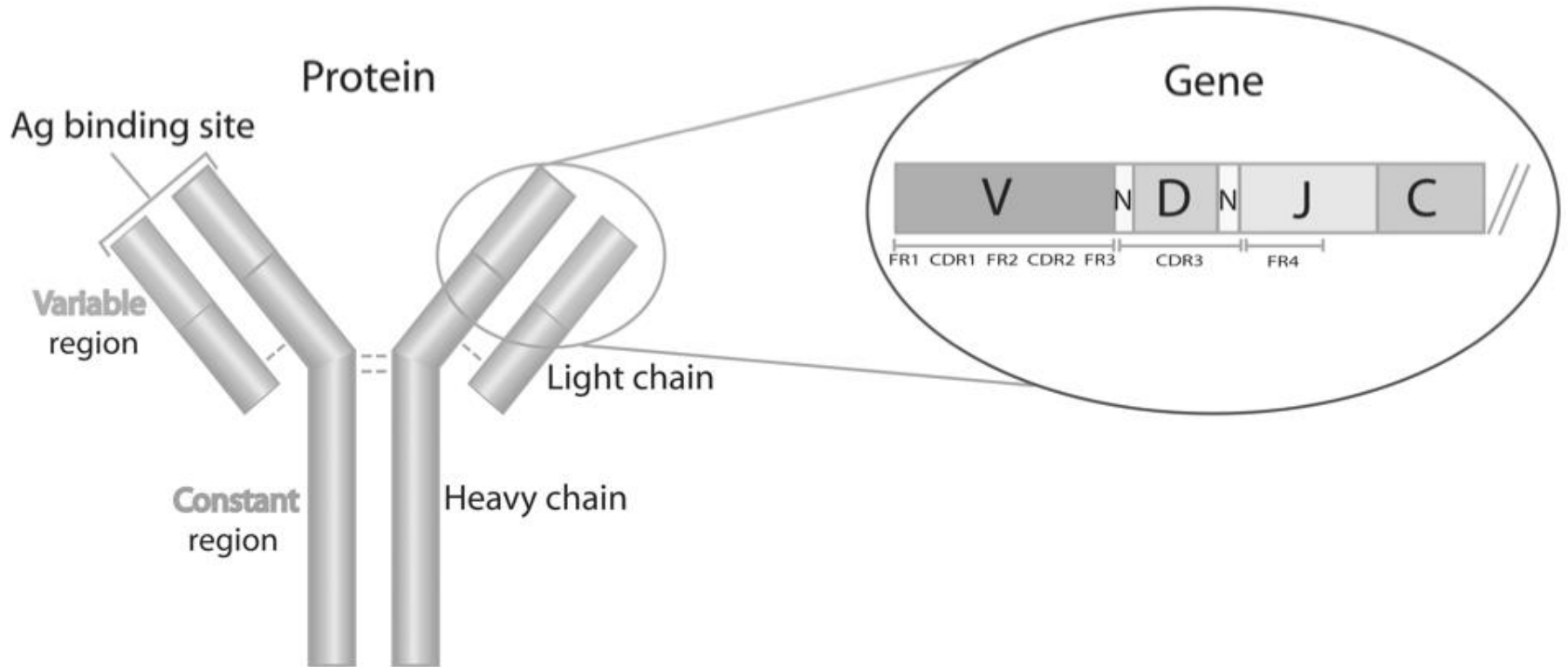
La PCR si usa per monitorare la malattia minima residua (**Gold standard in diagnosi è la FISH**)

t(14;18)

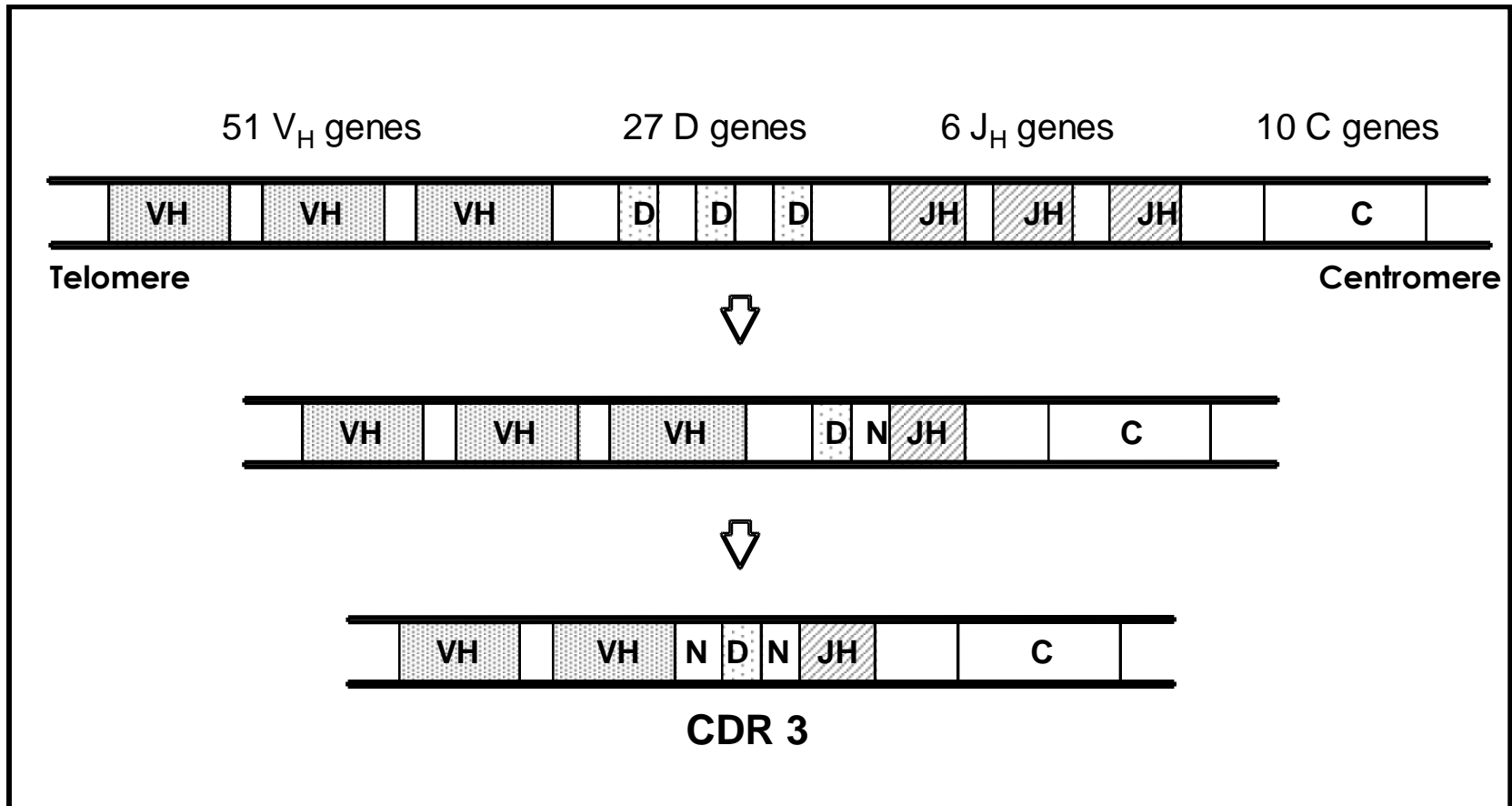
Presente nel 90% dei linfomi follicolari e nel 20% dei linfomi diffusi a grandi cellule B.

La PCR viene usata per monitorare la malattia minima

Immunoglobulina



Immunoglobulin heavy chain genes

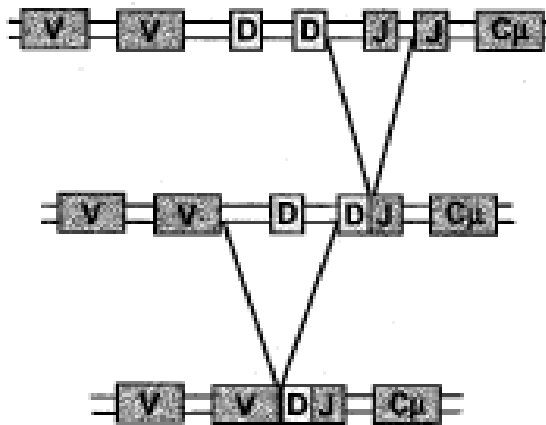


chromosome 14q32

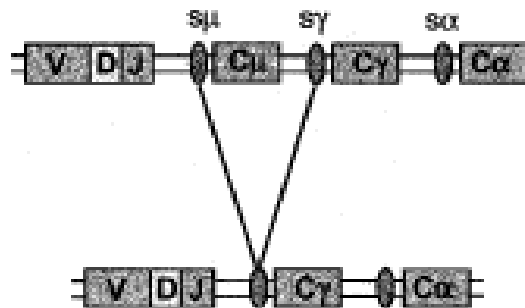
Tobin et al, 2006

Ulteriori riarrangiamenti nel locus delle IgH

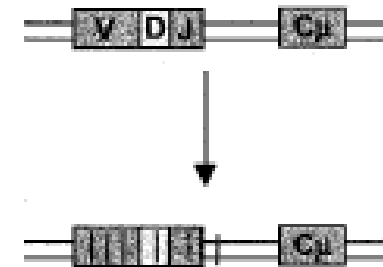
V(D)J recombination



Class switch recombination



Somatic hypermutation



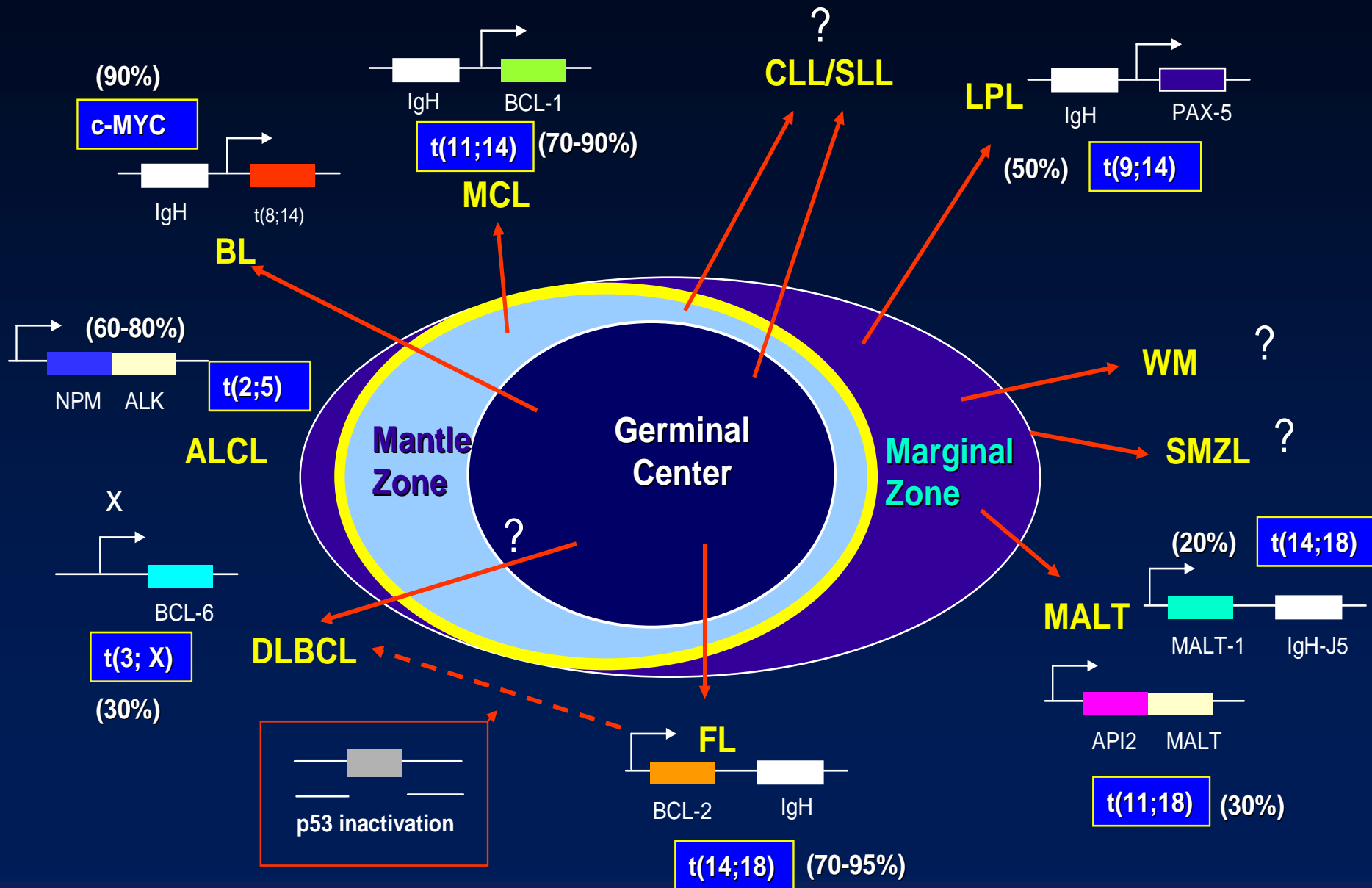
L' esteso riarrangiamento a carico dei geni codificanti le Ig comporta:

- la creazione di un marker linfocita-specifico
- il rischio di traslocazioni

Riarrangiamenti delle IgH e linfomi

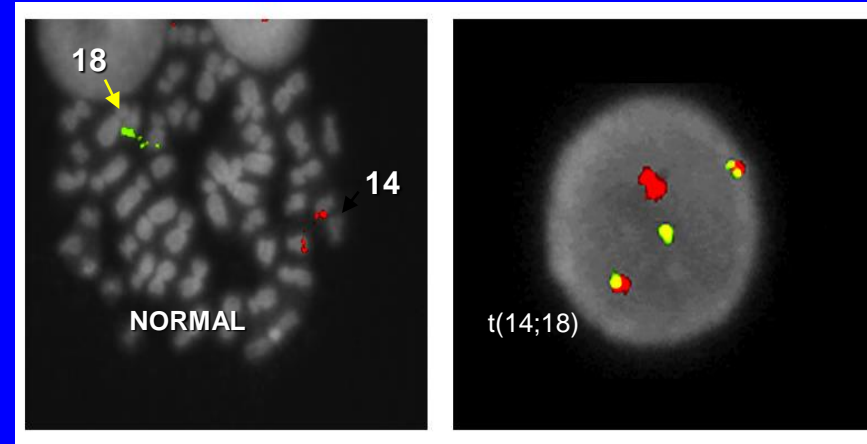
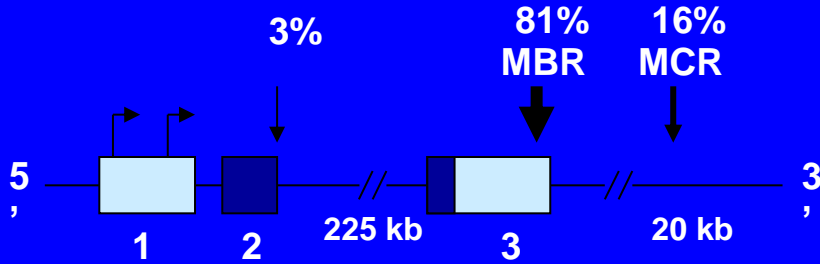
<i>Enzyme machinery</i>	<i>Type of molecular process</i>	<i>Examples</i>
V(D)J recombination	(i) translocation of oncogene to Ig (D)J locus; (ii) deletions in oncogenes or tumor suppressor genes; (iii) transposition of genes into the Ig locus	- <i>bcl-1</i> /IgH in MZL - <i>bcl-2</i> /IgH in FL - ^a (TAL 1 and MTS1 in T cell leukemias) - <i>bcl-2</i> in FL
Ig class switching	(i) translocation of oncogene to IgH switch regions; (ii) insertion of excised switch sequences into other loci	- <i>bcl-3</i> /IgH in B-CLL - <i>bcl-6</i> /IgH in DLCL - <i>c-myc</i> /IgH in BL - FGFR/IgH in MM - insertion into cyclin D1 in MM
Somatic hypermutation	(i) translocation of oncogene into rearranged V genes; (ii) somatic mutations in non-Ig genes; (iii) translocation of mutating oncogene	- <i>c-myc</i> /IgH in BL - <i>bcl-6</i> /IgL in DLCL - <i>bcl-6</i> , CD95/Fas in various NHL - Pax-5, <i>c-myc</i> , Pim-1, Rho/TTF in DLCL - <i>bcl-6</i> , Pax-5, Pim-1, Rho/TTF

RECURRENT GENETIC LESIONS IN MATURE B-CELL NHL

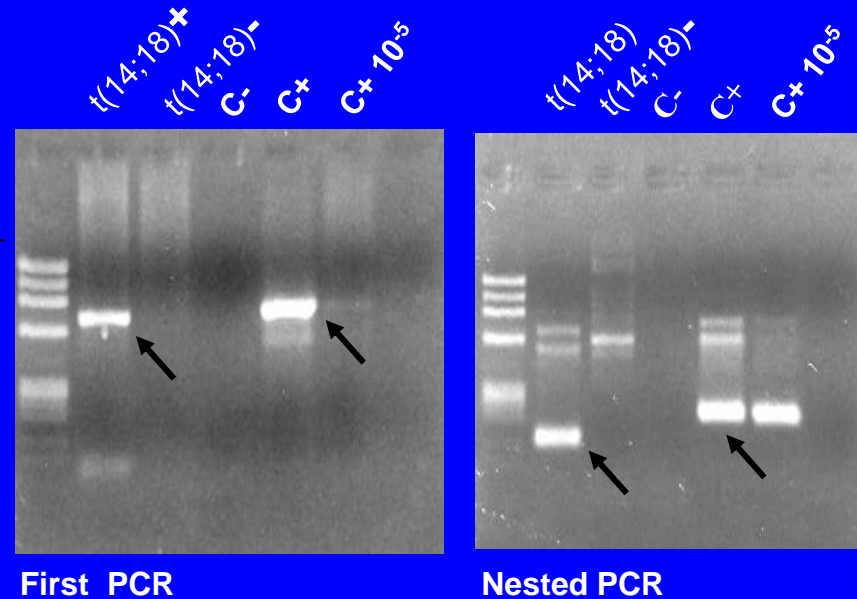
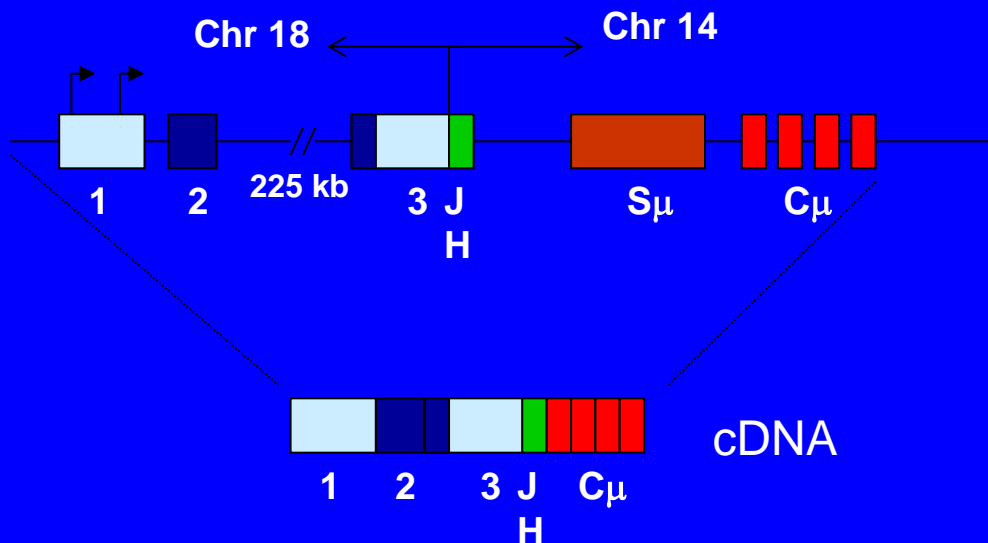


Schematic representation of BCL-2 translocation

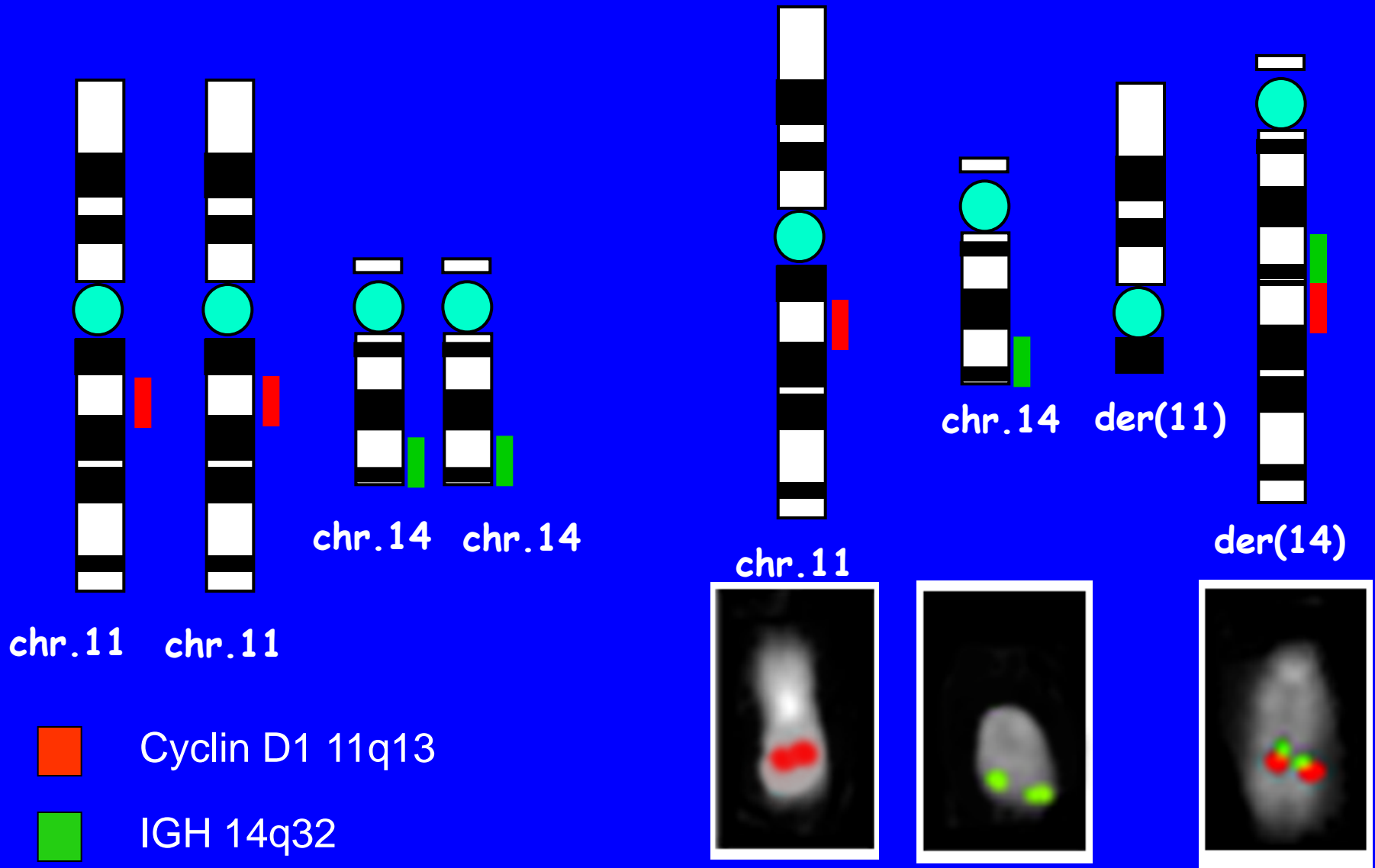
Germline BCL-2 chr 18q21



Genomic DNA Chr 14q+



Analisi su nuclei in metafase di un traslocazione cromosomica t(11;14)(q13;q32) in linfoma mantellare



CITOGENETICA CLASSICA

PERMETTE DI VALUTARE I RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI con un limite di risoluzione abbastanza grossolano

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

11q23 indica Cromosoma 11

estremità braccio lungo q

banda 2

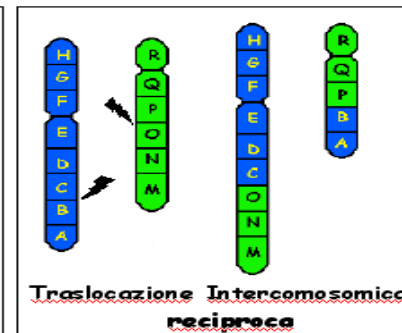
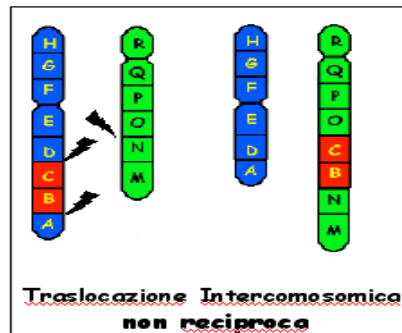
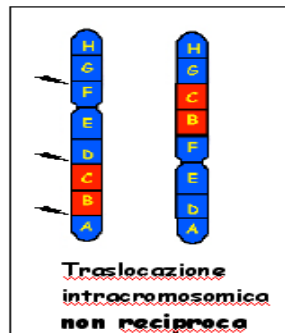
sottobanda 3

POSSIAMO AVERE DELEZIONI, INVERSIONI, DUPLICAZIONI E TRASLOCAZIONI

Traslocazioni

SI DISTINGUONO IN:

- INTRACROMOSOMICHE E INTERCROMOSOMICHE
- RECIPROCHE E NON RECIPROCHE



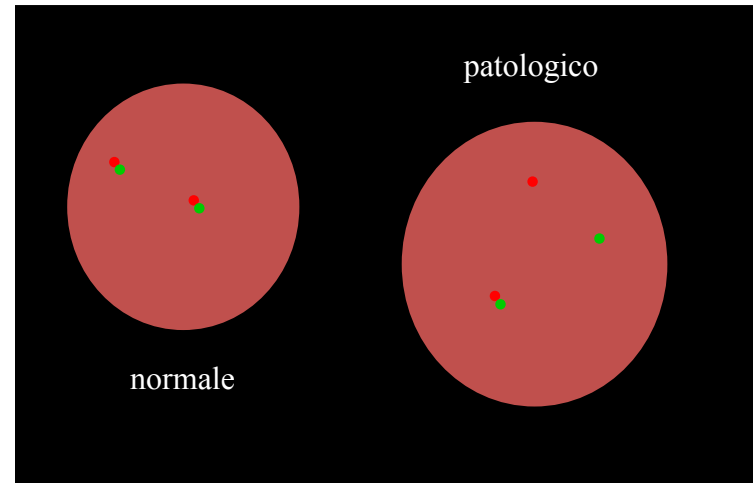
CITOGENETICA MOLECOLARE

Consente di effettuare un'analisi del DNA, per valutare riarrangiamenti di minore entità, mediante sonde marcate con fluorocromi emittenti a diverse lunghezze d'onda (**FISH**: Fluorescence In Situ Hybridation)

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.

Risultato atteso



Le malattie Mieloproliferative

*Sindromi Mieloproliferative
Croniche*

Leucemie Mieloidi acute

Sindromi Mielodisplastiche

CLASSIFICAZIONE WHO 1997

Malattie mieloproliferative

Leucemia Mieloide Cronica, cromosoma Philadelphia positiva [t(9;22)(q34;q11), bcr/abl]
Leucemia cronica neutrofilica
Leucemia cronica eosinofila / sindrome ipereosinofila
Mielofibrosi Idiopatica cronica
Policitemia Vera
Trombocitemia Essenziale
Malattia mieloproliferativa non classificata

Malattie mielodisplastiche / mieloproliferative

Leucemia MieloMonocitica Cronica
Leucemia mieloide cronica atipica
Leucemia mielomonocitica giovanile

Sindromi mielodisplastiche

Anemia Refrattaria
con sideroblasti ad anello
senza sideroblasti ad anello
Citopenia refrattaria (sindrome mielodisplastica)
con displasia multilineare
Anemia Refrattaria (sindrome mielodisplastica)
con Eccesso di Blasti
Sindrome 5q-
Sindrome Mielodisplastica non classificata

Leucemie Acute Mieloidi

LAM con traslocazioni citogenetiche ricorrenti:

LAM con t(8;21)(q22;q22), aml1(cbfa)/eto
LA Promielocitica [LAM con t(15;17)(q22;q21) e var, pml/rara]

LAM con eos. mid. [inv(16)(p13;q22) o t(16;16), cbfb/myh11]

LAM con anomalie 11q23 (mll)

LAM con displasia multilineare

con precedente sindrome mielodisplastica
senza precedente sindrome mielodisplastica

LAM e sindromi mielodisplastiche correlate a terapie

correlate ad agenti alchilanti
correlate a epipodofillotossine
altri tipi

LAM non altrimenti classificate

LAM scarsamente differenziata, M0

LAM senza maturazione, M1

LAM con maturazione, M2

LA promielocitica, M3

LA mielomonocitica, M4

LA monocitica, M5

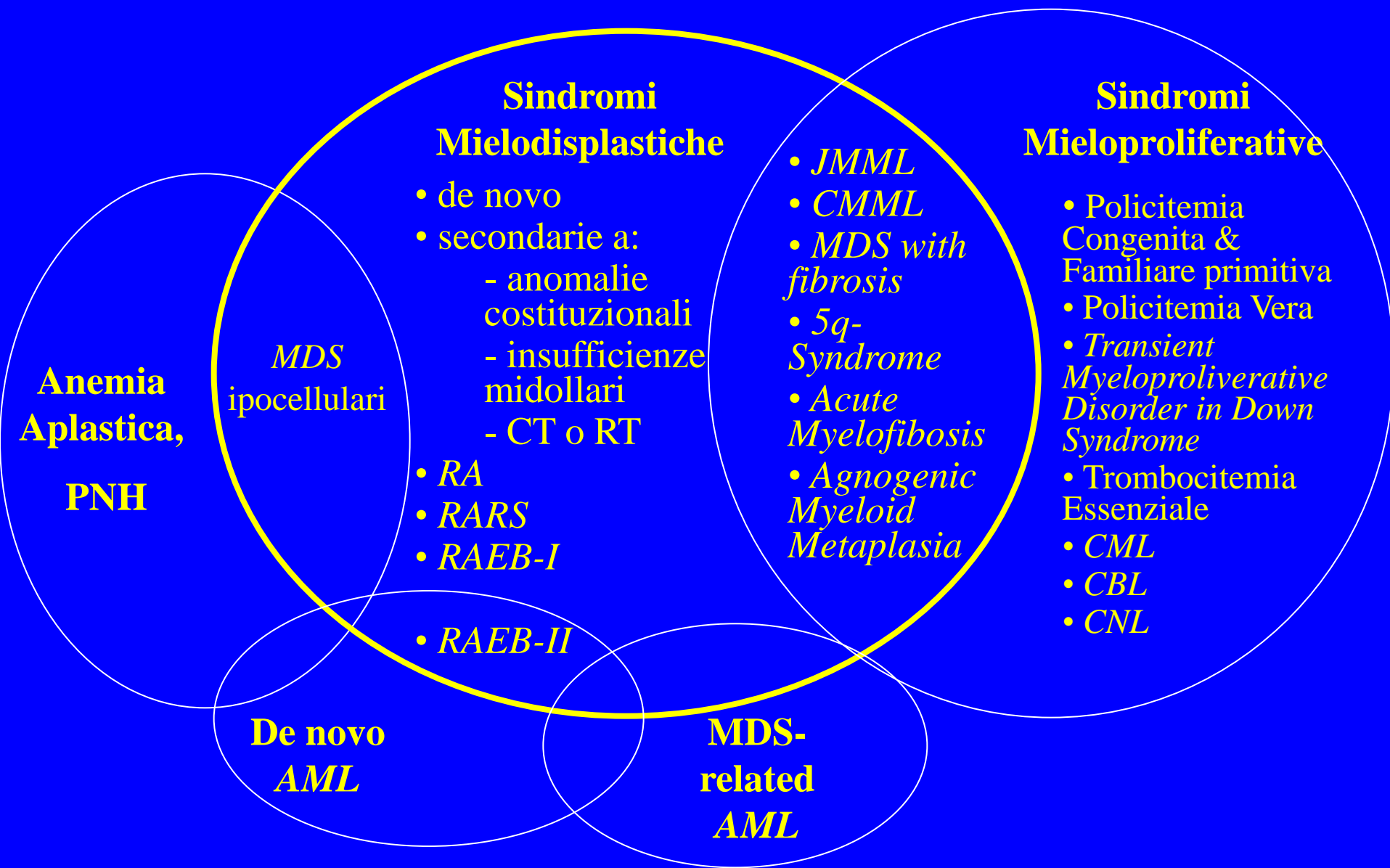
LA eritroide, M6

LA megacariocitica, M7

LA basofilica

Panmielosi acuta con mielofibrosi

Leucemie acute bifenotipiche



LEUCEMIE ACUTE

Le leucemie derivano da alterazioni molecolari presenti a livello di un precursore ematopoietico

Leucemie acute linfoblastiche (ALL)	70%
Leucemie acute non linfoblastiche (AML)	30-40%
Leucemie mieloidi croniche (LMC)	3%
Leucemie linfocitiche croniche (CLL)	rare

Relazioni tra INSORGENZA MALATTIA e PRESENZA di ALTERAZIONI CROMOSOMICHE

In cui sono coinvolti

Geni per fattori di trascrizione

Anomalie regolazione del sistema emopoietico e dei processi apoptotici

DEFINIZIONI UTILI

ONCOGENI: promuovono la proliferazione cellulare

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

ONCOSOPPRESSORI: i loro prodotti inibiscono la proliferazione cellulare

Leucemie Acute Mieloidi (LAM)

Criteria morfologici (FAB) e Immunofenotipici

- M₀ Mieloblastica senza maturazione
- M₁ Mieloblastica con minima maturazione mieloide
- M₂ Mieloblastica con distinta maturazione mieloide
- M₃ Promielocitica
- M₄ Mielomonoblastica
- M₅ Monoblastica
- M₆ Eritroblastica
- M₇ Megacarioblastica

Classificazione leucemie (WHO) e relazioni con sistema FAB

1. LMA CON TRASLOCAZIONI CITOGENETICHE RICORRENTI

- LMA con t(8;21)(q22;22), AML1(CBF α)/ETO **M2**, t(8;21)(q22;22), AML1(CBF α)/ETO
- Leucemia Promielocitica Acuta [LMA con t(15;17)(q22;q11-12) e varianti PML/RAR α] **M3**
- LMA con ipereosinofilia midollare [inv(16)(p13;q22) o t(16;16)(p13;q11), CBF β /MYH11X] **M4eo**
- LMA con anomalie 11q23

2. LMA CON DISPLASIA MULTILINEARE

- Secondaria a sindrome mielodisplastica o sindromi mielodisplastiche/malattie mieloproliferative de novo

3. LMA E SINDROMI MIELODISPLASTICHE SECONDARIE A CHEMIOTERAPIA

- Secondaria ad agenti alchilanti
- Secondaria a epipodofillotossine
- Altri tipi

4. LMA NON ALTRIMENTI CLASSIFICATA

- LMA con differenziazione minima **M0**
- LMA senza maturazione **M1**
- LMA con maturazione **M2**
- Leucemia mielomonocitica acuta **M4**
- Leucemia monocitica acuta **M5**
- Leucemia eritroide acuta **M6**
- Leucemia megacariocitica acuta **M7**
- Leucemia basofila acuta
- Panmielosi acuta con mielofibrosi
- Sarcoma mieloide (granulocitico)

MIELODISPLASIE (MDS)

Nelle **MIELODISPLASIE** la cellula staminale matura in modo disordinato, con alterazioni morfologiche (**DISMIELOPOIESI**) e con **EMATOPOIESI INEFFICACE**. Midollo ipercellulare.

La clinica è dominata dalla **CITOPENIA PROGRESSIVA** mono-, bi- trilineare, con i relativi effetti collaterali, in particolare dovuti allo stato carenziale.

Terapia: nei pazienti ad alto rischio di evoluzione, CT e trapianto allogenico (in base all'età), minitrapianto; nei pazienti a basso rischio, terapia di supporto, immunosoppressivi, androgeni

I problemi più rilevanti sono determinati da:

- **diagnosi differenziale tra diverse forme mielodisplastiche**

- * **variabilità entro paziente della valutazione anatomopatologica** (cellularità all'esordio, durante la malattia, evoluzione blastica)

- * **l'elevata eterogeneità delle SDO entro paziente (codici ICD9cm)**

- * **effettiva data di incidenza** specie in pazienti a basso rischio e anziani con diagnosi ambulatoriale

- * **Il ruolo della terapia come elemento di conferma della patologia**

MIELODISPLASIE (MDS)

CLASSIFICAZIONE FAB

DIFFERENZE TRA FAB e WHO

- **Anemia Refrattaria con sideroblasti ad anello (RARS) 36%**
- **Anemia Refrattaria con eccesso di Blasti (RAEB) 15%**
- **Anemia Refrattaria (RA) 26%**
- **Anemia Refrattaria con eccesso di Blasti in trasformazione (RAEB -t) 8%**
- **Leucemia MieloMonocitica Cronica (CMML) 15%**

ELIMINATA : il numero di blasti CD34+ necessario per la diagnosi di AML scende dal 30 al 20%

(in tale intervallo l' evoluzione in AML avveniva entro 3 mesi per il 25 % dei casi ed entro 1 anno per oltre il 60 % dei casi)

SPOSTATA NEL GRUPPO DELLE ALTRE LEUCEMIE, PRIMA ERA TRA LE MIELOIDI

I pazienti con le abnormalità citogenetiche: t(8;21) , inv (16) , t (16;16) , t (15;17) sono classificati come AML qualunque sia il numero dei blasti

CLASSIFICAZIONE WHO DELLE MDS

- **Anemia Refrattaria (RA)**
- **Anemia Refrattaria con sideroblasti ad anello (RARS)**

- **Citopenia Refrattaria con Displasia Multilineare (RCMD)**
- **Citopenia Refrattaria con Displasia Multilineare e Sideroblasti ad anello (RCMD-RS)**

- **Anemia Refrattaria con eccesso di Blasti - 1 (RAEB-1)**
- **Anemia Refrattaria con eccesso di Blasti - 2 (RAEB-2)**

- **Sindrome Mielodisplastica non classificabile (MDS-U)**
- **Sindrome Mielodisplastica con del (5q)**

DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE MDS

	RA	RARS	RCMD	RCMD-RS	RAEB-1	RAEB-2	MDS-U	MDS - 5q-
Sangue periferico	Anemia		Bi- o Pancitopenia		Citopenie		Citopenie	Anemia
	Assenza di blasti		Assenza o rari blasti		< 5% di blasti	5-19% di blasti	Assenza o rari blasti	< 5% di blasti
			Assenza di corpi di Auer		Assenza di corpi di Auer	Corpi di Auer ±	Assenza di corpi di Auer	
			< 10 ⁹ /l. monociti		< 10 ⁹ /l. monociti			Piastrine normali o aumentate
Aspirato midollare	Displasia eritroide		Displasia > 10% in 2 o più linee mieloidi		Displasia in una o + linee mieloidi		Displasia unilineare mieloide o megacariocitaria	Normali o aumentati (micromegacariocitari)
	< 5% blasti		< 5% blasti		5-9% di blasti	5-19% di blasti	< 5% blasti	
	< 15% sideroblasti ad anello	≥ 15% sideroblasti ad anello	< 15% sideroblasti ad anello	≥ 15% sideroblasti ad anello				
			Assenza di corpi di Auer		Assenza di corpi di Auer	Corpi di Auer ±	Assenza di corpi di Auer	
								Delezione isolata 5q

DIAGNOSI SOLO CLINICA DI MIELODISPLASIA

Specie nel paziente anziano non vengono eseguite particolari indagini e viene posta una diagnosi su base clinica.

Per la registrazione sarebbe opportuna una valutazione dell'ematologo sulla base delle informazioni raccolte. Quali?

-Emocromocitometrico: se non c'è riduzione di eritrociti, leucociti o piastrine in circolo e non è stata effettuata terapia di supporto trasfusionale è difficile parlare di eritropoiesi inefficace

-Volume globulare medio: deve essere **superiore alla norma** e non deve esservi uno stato carenziale. Volumi inferiori alla norma depongono per anemie da perdita o da malattia cronica

-Dosaggi di Ferro, Ferritina, Vitamina B12, folati: non devono essere inferiori alla norma per escludere uno stato carenziale. Spesso si rilevano valori elevati.

La raccolta di questi elementi consente revisioni a posteriori

MALATTIE MIELOPROLIFERATIVE (MPS)

Sono determinate da una trasformazione neoplastica di una cellula progenitrice emopoietica in sede midollare. I blasti midollari sono < 20%
Nella mielofibrosi questa si associa ad una fibrosi reattiva negli spazi midollari con conseguente eritropoiesi inefficace. Oltre alla mielofibrosi primaria, anche le altre MPS possono determinare una mielofibrosi secondaria, e si ha una emopoiesi extramidollare.

Marcatori: **blasti CD 34+** (se elevati differenzia mielofibrosi da PV o TE)
gene JAK2 (Janus Kinase 2) positivo in MF, PV e TE
questo gene produce una tirosin-chinasi

Hanno sempre un'ematopoiesi inefficace, ma CELLULARITA' ELEVATA NEL SANGUE.

La clinica è condizionata anche dagli effetti di iperviscosità ematica.
La terapia è di supporto e citoreducente (anche trapianto e terapie sperimentali). Salasso nelle PV

DIAGNOSI DIFFERENZIALE DELLE MPS

Differenziazione fra LMC, varie sindromi mieloproliferative e reazione leucemoide

<i>Caratteri</i>	LMC	Policitemia Vera	Mielofibrosi Idiopatica	Trombocit. Essenziale	Reaz. leucemoide
Leucocitosi	+++	+	+	+	+
Splenomegalia	++	+	+++	+	-
Eosinofili nel sangue	++	+	+	+	-
Basofili nel sangue perif	++	+	+	+	-
Piastrinosi	++	+	+	+++	-
Fibrosi midollare	++	+	+++	+	-
Fosfatasi alcalina leucoc.	rid./assente	normale	aum./norm.	aum./norm.	normale
Cromosoma Ph ¹	+	-	-	-	-

LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

Il cromosoma Philadelphia (Ph) è il marcatore genetico caratteristico per traslocazione reciproca tra un cromosoma 9 ed un cromosoma 22. $t(9;22)$ con formazione di un gene di fusione; il gene *abl* sul cromosoma 9 appartiene alla categoria delle tirosin chinasi. E' positivo nel 95% dei casi

Il gene ibrido *bcr-abl* codifica per la proteina p210 in quasi tutti i casi di LMC ed in circa il 50% di LLA Ph positiva.

Tale proteina mantiene una attività TK elevata e sempre attivata, con:

- * interferenze con l'attività proliferativa della cellule emopoietiche
- alterazione dei meccanismi di adesione e responsività ai fattori regolanti la proliferazione
- ridotta apoptosi (morte cellulare).

Terapie : Convenzionali (CT citotossica, interferone, trapianto allogenico)
inibitori della tirosin-chinasi (imatinib)

CRITERI DIAGNOSTICI NELLA ET⁵⁹

Criteria maggiori:

- ❖ trombocitosi $> 600.000/\text{mm}^3$ per almeno 2 mesi
- ❖ presenza della mutazione JAK2 V617F

Criteria minori:

- ❖ assenza di cause di trombocitosi reattiva (normali indici infiammatori)
- ❖ nessuna evidenza di carenza marziale (ferro)
- ❖ nessuna evidenza di PV
- ❖ nessuna evidenza di LMC
- ❖ nessuna evidenza di mielofibrosi
- ❖ nessuna evidenza di mielodisplasia

Si pone diagnosi di ET se sono soddisfatti:

- ❖ due criteri maggiori + gli ultimi quattro minori (JAK pos.)
- ❖ primo criterio maggiore + tutti i sei minori (JAK neg.)

CRITERI DIAGNOSTICI DELLA PV

Criteria maggiori:

- ❖ aumento massa GR $> 25\%$ rispetto al valore medio o ematocrito $> 60\%$ (uomini) e $> 56\%$ (donne)
- ❖ assenza di cause di eritrocitosi secondaria (normale saturazione O_2 arterioso, non incremento di EPO)
- ❖ splenomegalia palpabile
- ❖ presenza mutazione JAK2 V617F o di altre anomalie citogenetiche (esclusa bcr/abl) nelle cellule emopoietiche

Criteria minori:

- ❖ trombocitosi $> 400 \times 10^9/\text{L}$
- ❖ neutrofilia (neutrofili $> 10 \times 10^9/\text{L}$; $> 12,5 \times 10^9/\text{L}$ nei fumatori)
- ❖ splenomegalia radiologicamente documentata
- ❖ colonie eritroidi endogene o bassi livelli di EPO

Diagnosi di PV se sono soddisfatti:

- ❖ i primi due criteri maggiori + un altro criterio maggiore
- ❖ i primi due criteri maggiori + due criteri minori

* American Society of Hematology 2005⁵⁶

Le malattie linfoproliferative

Linfomi

```
graph LR; A[Linfomi] --> B["LH (LINFOMA o MALATTIA o MORBO DI HODGKIN)"]; A --> C["LNH (LINFOMI NON HODGKIN)"];
```

LH (LINFOMA o MALATTIA o MORBO DI HODGKIN)

LNH (LINFOMI NON HODGKIN)

Mieloma Multiplo o Plasmocitoma

I linfomi - epidemiologia

- I LNH rappresentano il 4% di tutti i tumori maligni. 53.900 nuovi casi attesi per l'anno 2002
- Incidenza annua pari a 19.1 casi/100.000 nel periodo 1995-1999.
- Rapporto M/F pari a circa 1.5/1
- Incidenza superiore nelle aree urbane rispetto alle aree rurali

I linfomi - istotipi

- Distinzione in forme B e T a seconda della cellula di origine
 - Distinzione in forme Aggressive e Indolenti a seconda dell'andamento clinico della malattia
 - I linfomi maligni comprendono i Linfomi non-Hodgkin ed i linfomi di Hodgkin
-

La diagnosi

- La diagnosi di linfoma può essere effettuata su biopsia linfonodale, biopsia ossea, cellule in sospensione
 - La diagnosi di un linfoma è un processo complesso che deve integrare discipline diverse (patologo, biologo molecolare, immunoistochimico, citogenetista, citofluorimetrista)
-

Classificazione dei LNH

1942	<i>Gall-Mallory</i>	linfoma gigantomfollicolare linfosarcoma reticulosarcoma
1954	<i>Rappaport</i>	dimensioni pattern di crescita
1974	<i>Lukes e Collins</i>	classificazione Immunologica
1975	<i>Kiel</i>	
1982	<i>W.F.</i>	grado di malignità
1994	<i>R.E.A.L.</i>	29 tipi di LNH
2000	<i>WHO</i>	38 tipi di LNH e 6 di MH

Classificazione (clinica)

LNH AD ALTO GRADO DI MALIGNITÀ

- centroblastico
- immunoblastico
- Burkitt
- a grandi cellule
- linfoblastico

LNH A GRADO BASSO o INTERMEDIO DI MALIGNITÀ

- linfocitico
- leucemia a cellule capellute (Hairy cell L.)
- immunocitoma
- follicolare
- mantellare
- marginale
- micosi fungoide
- angioimmunoblastico

**Classificazione Kiel
aggiornata 1988**

Pathology:

a more uniform NHL diagnosis

REAL/WHO classification system blends

- Histopathology
- Immunophenotype
 - B versus T cell of origin
 - identify rare tumours
 - mantle cell, CD30 positive NHL, etc...
- Cytogenetics/FISH
 - identify characteristic translocations
 - c-myc translocations of Burkitt's NHL
 - t(14:18) in follicular NHL
 - t(11:14) in mantle cell NHL
 - ...

WHO classification

ICD-O-3 (based on WHO classification)

9828/9735	Precursor B-lymphoblastic lymphoma/leukemia
9823/9670	CLL/Small lymphocytic lymphoma
9671	Lymphoplasmacytic Lymphoma/Immunocytoma
9699	Marginal zone B-Cell NHL
9940	Hairy cell leukemia
9690-9693	Follicular lymphoma
9673	Mantle cell lymphoma
9680-9686	Diffuse large B-cell lymphoma
9687	Burkitt lymphoma
9829/9737	Precursor T-lymphoblastic lymphoma/leukemia
9700	Mycosis fungoides
9702	Peripheral T-cell lymphomas, unspecified
9705	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
9714	Anaplastic large cell lymphoma
9717	Enteropathy-type T-cell lymphoma

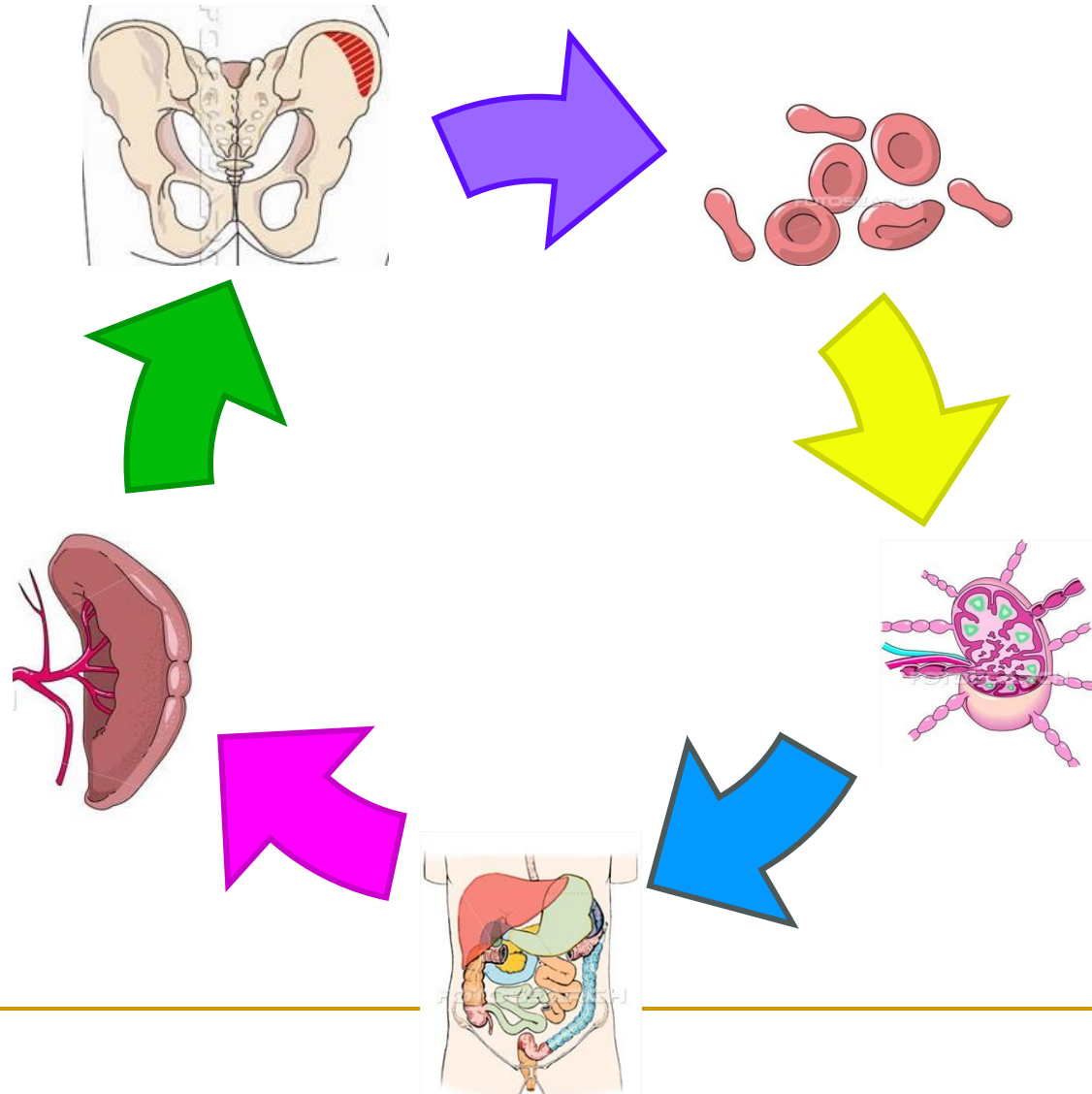
Clinical group

Precursor B
Indolent non follicular
Indolent follicular
Aggressive
Precursor T
Indolent non follicular
Aggressive

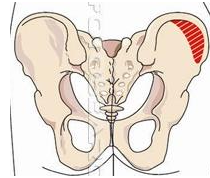
Distribuzione dei linfomi periferici in provincia di Modena nel periodo 1997-2003

PL subtype	ICD-O-3 codes	N	Freq. (all) %	Freq. (NHL) %	World ASR*			US ASR†
					M	F	Total	Total
B-cell lymphoma, all cases	9670–9699, 9761, 9823, 9940	1202	76	87.1	16.5	10.6	13.4	19.4
CLL/SLL	9670, 9823	327		23.7	4.5	2.3	3.3	5
LPCWM	9671, 9761	116		8.4	1.4	0.9	1.1	1.7
HCL	9940	19		1.4	0.4	0.1	0.2	0.3
FL	9690–9698	150		10.9	2.1	1.8	2	2.6
MZL	9689, 9699	137		9.9	1.7	1.3	1.5	2.2
MCL	9673	40		2.9	0.6	0.3	0.4	0.6
DLBCL and BL	9675–9687	413		29.9	5.8	4	4.8	6.8
T/NK-cell lymphoma, all cases	9700–9719	178	11.3	12.9	3.1	1.5	2.2	3
MF/SS	9700, 9701	117		8.5	2.1	0.8	1.4	1.9
PTCL	9702–9708, 9716–9719	34		2.5	0.5	0.3	0.4	0.5
ALCL	9714	27		1.9	0.4	0.4	0.4	0.5
Hodgkin lymphoma, all cases	9650–9667	154	9.7	—	3.7	3.1	3.4	3.4
PL, NOS	9590–9596, 9709, 9760, 9827–9834, 9970	48	3	—	0.5	0.4	0.4	0.7
All cases		1582			23.8	15.6	19.4	26.5

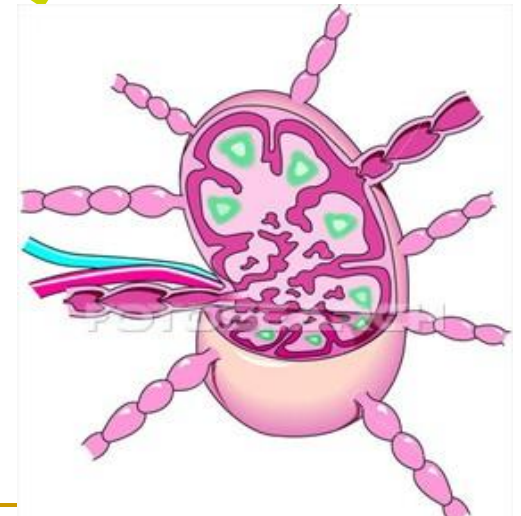
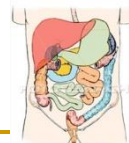
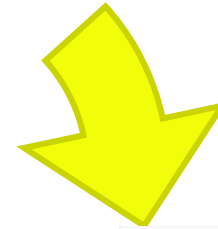
Linfomi. Gli organi coinvolti



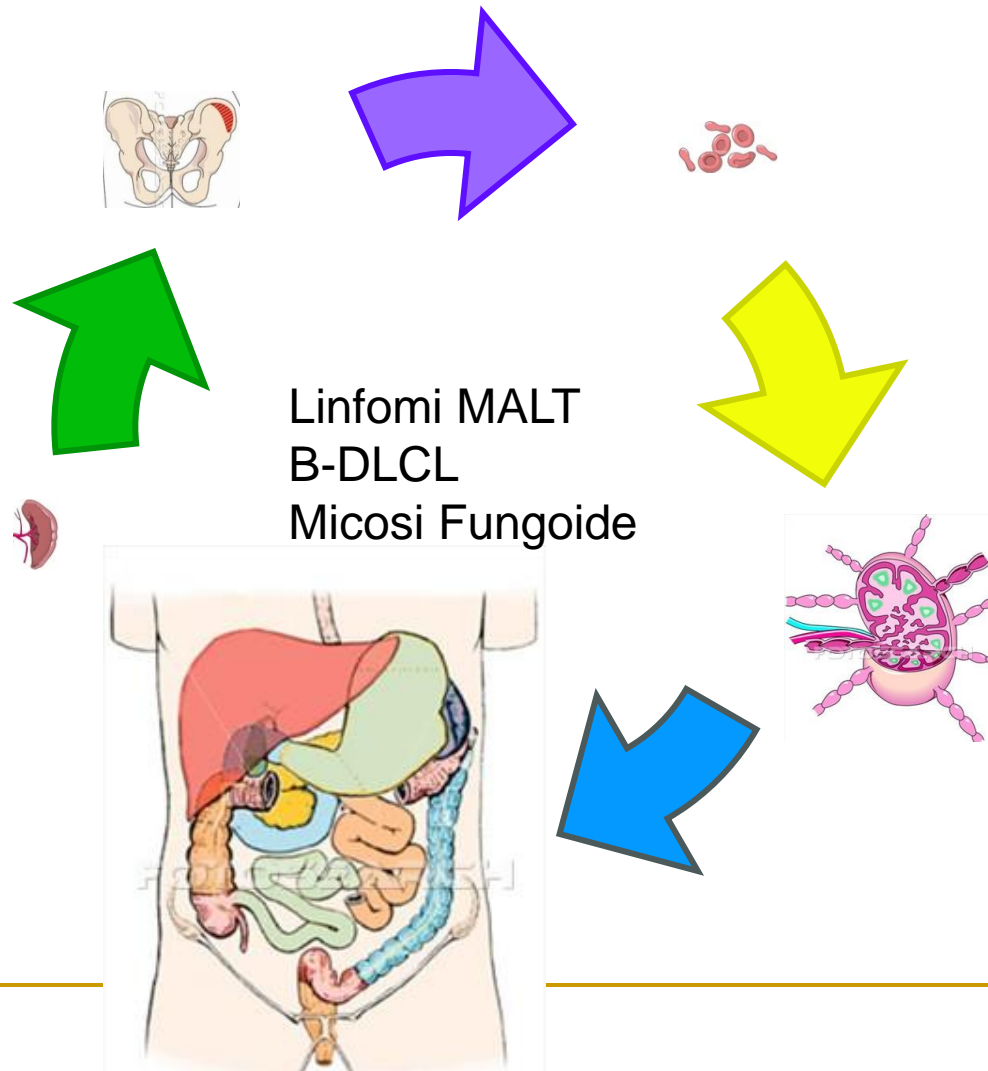
Linfomi. Forma Nodale



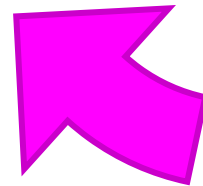
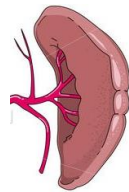
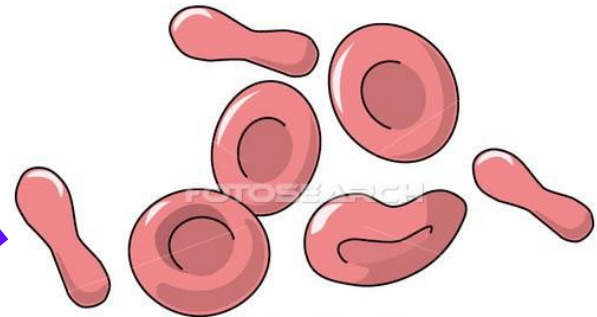
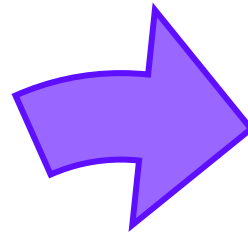
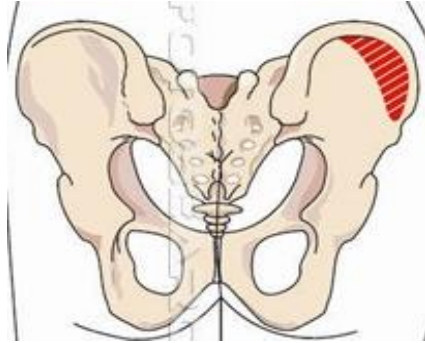
Linfoma di Hodgkin
B-DLCL
L. Follicolare
L. Linfocitico
L. Mantellare
PTCL-u
AITL



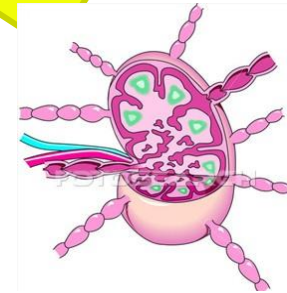
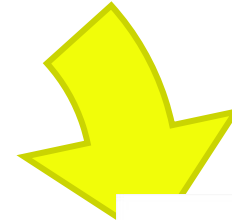
Linfomi. Forme Extranodali



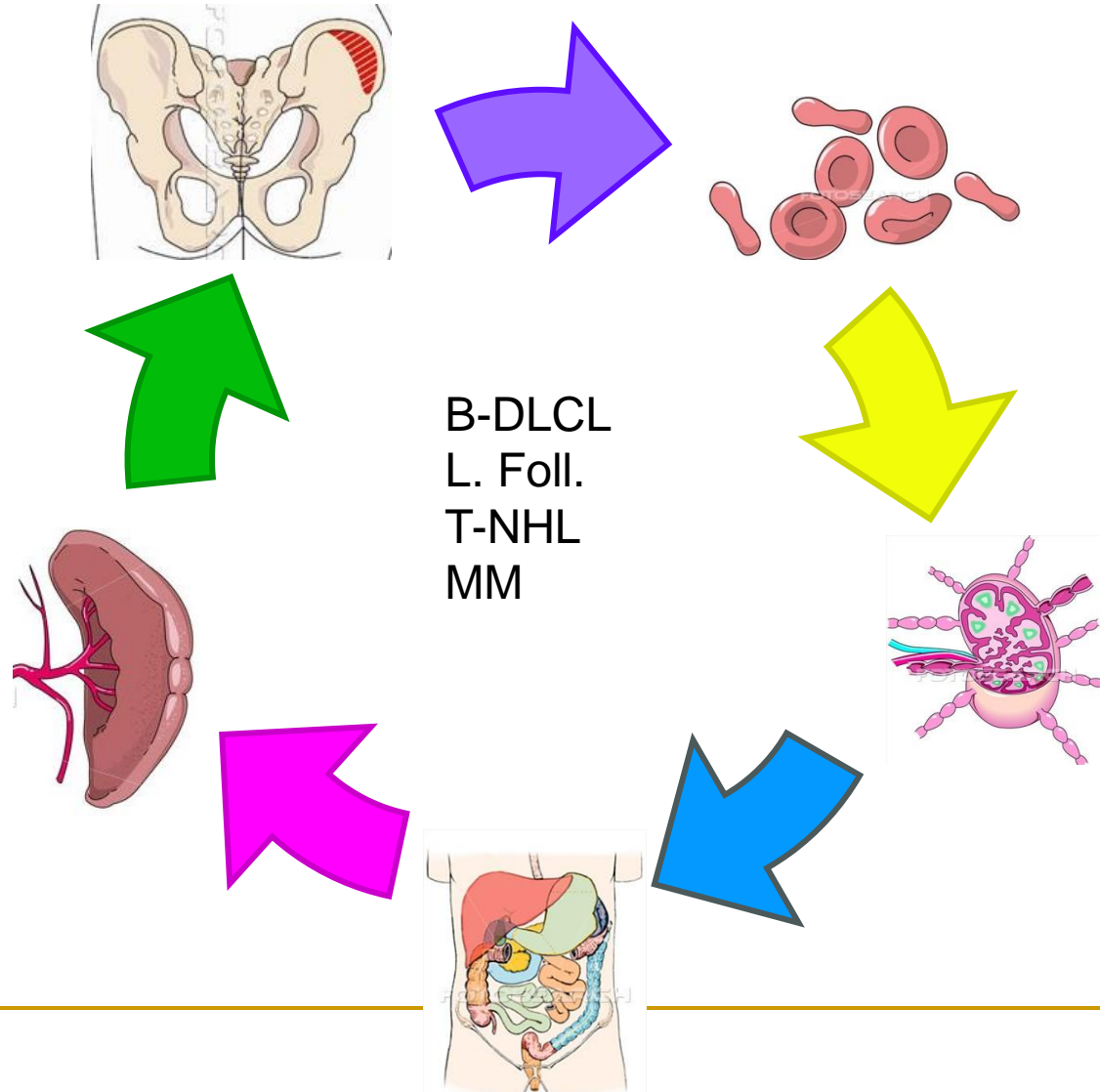
Linfomi. Forme Leucemiche



B-LLC
MCL
T-PLL
SMZL
HCL
MM



Linfomi. Forme disseminate



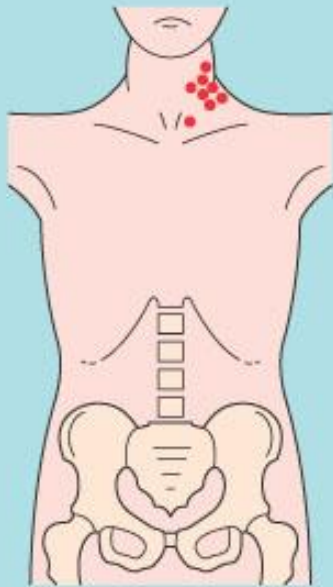
Stadiazione

- Modalità di stadiazione diversa basata su:
 - Numero e posizione dei linfonodi
 - Numero e modalità di interessamento dei tessuti extranodali
 - Interessamento del midollo osseo

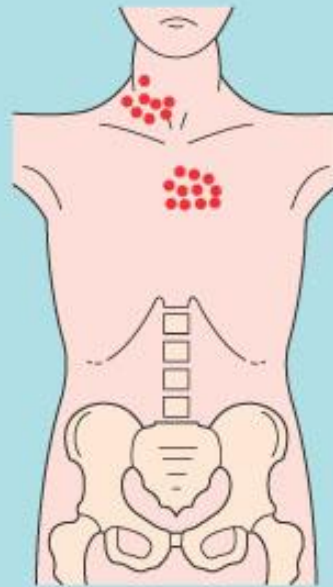
Accuratezza della stadiazione

- No TNM
- Codifica basata su valutazione visiva:
 - TAC collo, torace, addome con mdc
 - Biopsia ossea
- Migliore sistema disponibile per i linfomi:
 - Utile per la malattia nodale (LH)
 - Scarsa utilità per malattia avanzata (L. Indolenti), extranodale
- Sistemi alternativi per CLL e MM

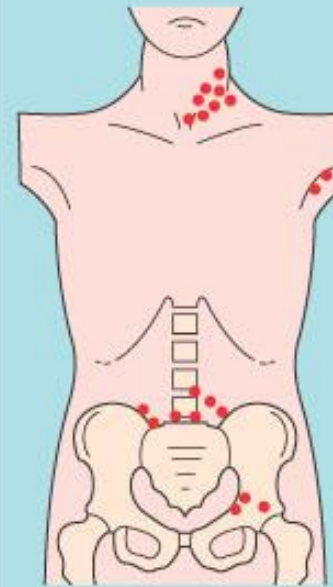
Accuratezza della Stadiazione



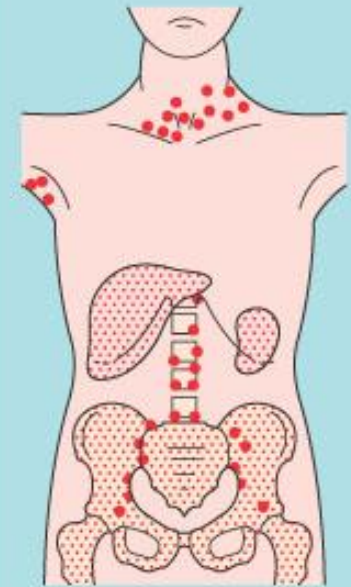
Stadio I:
coinvolgimento
di un singolo linfonodo
o un singolo sito
extralinfatico (I_E)



Stadio II:
coinvolgimento di due o
più linfonodi sullo stesso
lato del diaframma;
può includere
una localizzazione
extralinfatica sullo
stesso lato
del diaframma (II_E)



Stadio III:
coinvolgimento
di regioni
linfonodali su entrambi
i lati del diaframma;
può includere
la milza (III_S) o
la malattia extranodale
(III_E).



Stadio IV:
diffusa malattia
extranodale (fegato,
midollo osseo,
polmone, cute)

NB: se vi è una perdita di peso inspiegabile > 10% del peso abituale nei sei mesi precedenti e/o febbre > 38 °C e sudorazione notturna, la classificazione è B, se assente tale sintomatologia sistemica, A.

Stadiazione (sintomi sistemici)

Sintomi Sistemici:

1. Febbre
2. Sudorazione
3. Calo ponderale
4. prurito
5. dolore

A: assenza di sintomi

B: presenza di sintomi

BULKY (mediastino): linfonodo o agglomerato di linfonodi il cui diametro massimo supera i 10 cm (7 cm secondo Velasquez). Una massa mediastinica viene definita bulky se ad una radiografia P/A del torace il suo diametro trasverso massimo è \geq ad $1/3$ del diametro trasverso del torace

Definizione di malattia extranodale (EN)

[...]

EN lymphoma cases were defined by nodular or diffuse EN involvement excluding bone marrow and spleen involvement.

Primary EN lymphoma (PENL) was defined as a lymphoma with a prevalent involvement of one or more EN site (i.e. stage I-II E disease or stage III E-IV without bone marrow involvement and/or with minimal lymph node involvement).

[...]

I principali istotipi:
Linfoma di Hodgkin



Linfoma di Hodgkin

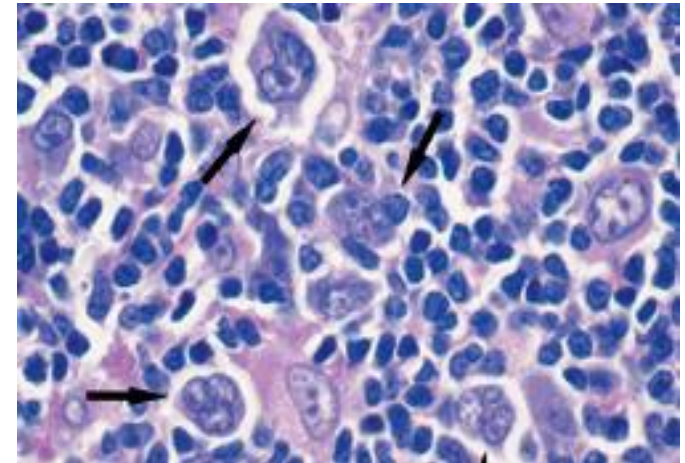
- Nei paesi occidentali, incidenza annua pari a 3/100.000 abitanti (M>F)

Secondo la ICD-O-3 esistono diversi sottotipi di Linfoma di Hodgkin:

- LH ricco di linfociti 9651/3
- LH cellularità mista 9652/3
- LH deplezione linfocitaria 9653/3-9655/3
- LH nodulare a predominanza linfocitaria 9659/3
- LH sclerosi nodulare 9663/3-9667/3

LH nodulare a predominanza linfocitaria

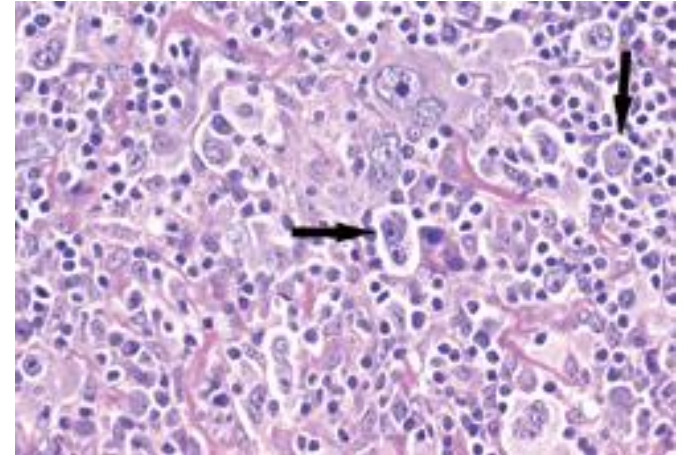
- Caratterizzato da proliferazione polimorfa nodulare o nodulare e diffusa di grandi cellule neoplastiche disseminate (popcorn cell)
- 5% dei LH
- Età mediana: 30-50
- Colpisce prevalentemente il sesso maschile



Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL). Three popcorn cells (arrows) with the typically lobated nuclei are visible in a background of small lymphoid cells and a few histiocytes.

LH sclerosi nodulare

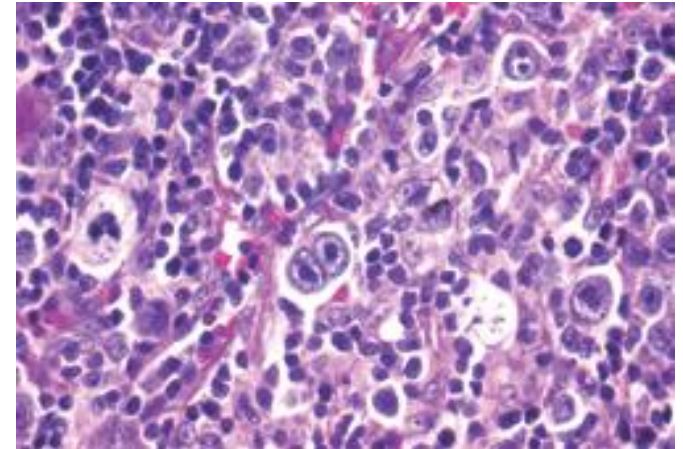
- Caratterizzato dalla presenza di cellule neoplastiche particolari dette lacunari e da abbondante tessuto fibroso (sclerosi) che delimita i noduli all'interno dei quali si trovano le cellule
- 70% dei LH
- Età mediana: 28
- M/F: 1/1



Nodular sclerosis subtype of classical Hodgkin lymphoma. Nodular sclerosis subtype of CHL. Several lacunar cells (arrowed) are present.

LH cellularità mista

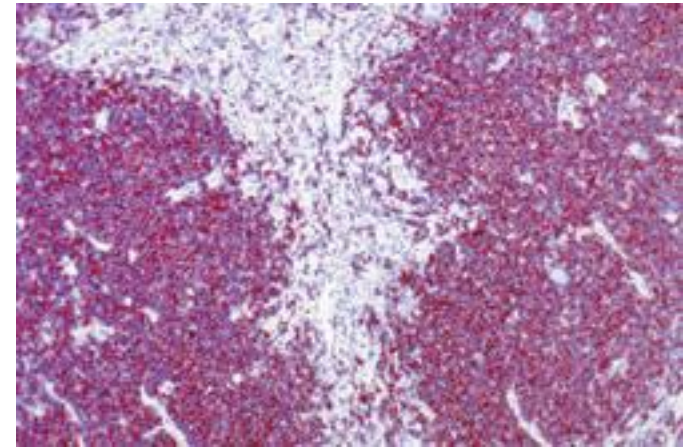
- Cellule neoplastiche numerose e ben evidenti, non si osservano fibrosi o noduli ben formati
- 20-25% dei LH
- Età mediana: 37
- 70% sesso maschile



Mixed cellularity subtype of classical Hodgkin lymphoma. A typical binucleated Reed-Sternberg cell in a mixed cellular infiltrate with lymphocytes, macrophages and eosinophils visible.

LH ricco di linfociti

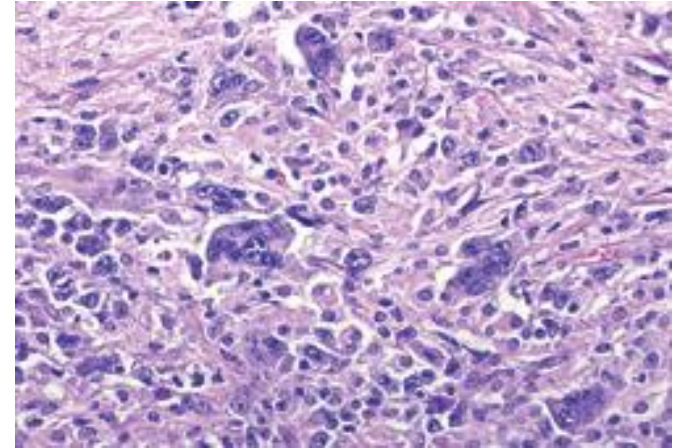
- Caratterizzato da diffusa proliferazione di piccoli linfociti per lo più T commista a numerose cellule H-RS a tipica morfologia.
- 5% dei LH
- Età mediana > rispetto agli altri sottotipi
- 70% sesso maschile



Nodular lymphocyte rich subtype of classical Hodgkin lymphoma. Immunostaining for CD20 shows that the nodules predominantly consist of small B cells. The holes contain HRS cells.

LH deplezione linfocitaria

- Raggruppa espressioni eterogenee dei LH caratterizzate però tutte da spiccata deplezione linfocitica
- < del 5% dei LH
- Età mediana: 37
- 75% sesso maschile



Lymphocyte depleted subtype of classical Hodgkin lymphoma. Many bizarre large and small HRS cells are present in a cellular background rich in fibrillary matrix.

Precursor B and T cell neoplasms

- Precursor B-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma
 - 9836/3, 9728/3
 - Neoplasm of lymphoblasts committed to the B-cell lineage involving bone marrow and peripheral blood (B-ALL)
 - Immunophenotype: CD19+, cytoplasmic CD79a+, CD10+/-, CD24+/-, TdT+, CD20-/+ , CD22+/-, CD45+/-, s-Ig-(/+)

- Precursor T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma
 - 9837/3, 9729/3
 - Neoplasm of lymphoblasts committed to the T-cell lineage involving bone marrow and peripheral blood (T-ALL) or nodal or extra nodal tissues (T-LBL)
 - Immunophenotype: TdT+, cytoplasmic CD3+ and CD7+, coexpression of CD4 and CD8, CD1a+/-, CD2+/-, CD4+/-, CD5+/-, CD8+/-, CD10-/+ , CD79a-/+.

I principali istotipi:
**Linfoma non-Hodgkin
indolente**

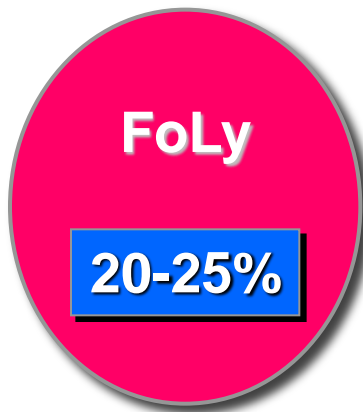


Linfomi non-Hodgkin indolenti

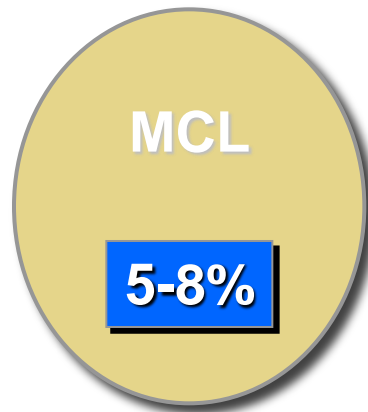
- **Definizione:** gruppo clinicamente eterogeneo di linfomi della linea cellulare B matura, caratterizzati da un decorso clinico “indolente” e lunga sopravvivenza pur in assenza del raggiungimento di una risposta clinica completa. La loro leucemizzazione costituisce il capitolo delle sindromi linfoproliferative croniche.

Rappresentano il 30-40% dei LNH

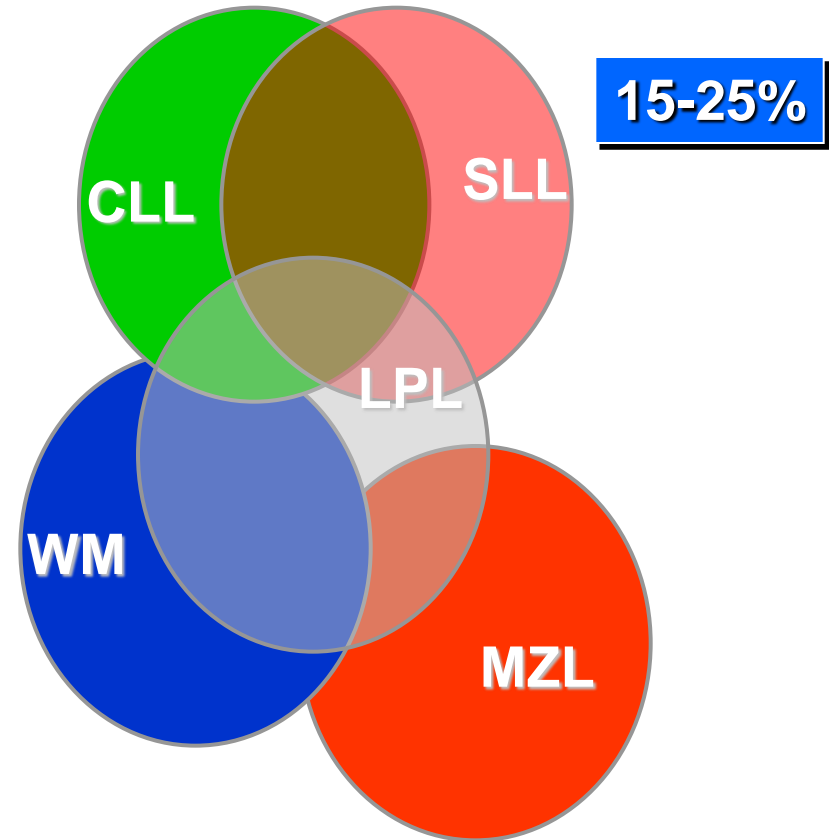
Spectrum of Indolent B-cell NHL



**t (14; 18)
BCL-2**



**t (11; 14)
BCL-1**



t (9;14), del 6q21, t(11;18), t (14;18)del (13q), +12, +18, +3

Linfomi Indolenti non-Follicol.

- Gruppo di linfomi caratterizzati dalla proliferazione di linfociti B-maturi, che comprendono:
 - Linfoma linfocitico
 - Immunocitoma/ Linfoma linfoplasmacitico
 - Linfoma marginale
- Approccio clinico omogeneo
- Età avanzata della maggior parte pz
- Malattia non eradicabile

Caratteristiche cliniche dei LNH indolenti

- Età media: 60-65 anni
- 70-80% dei pazienti in stadio IV (per impegno midollare)
- 20-30% dei pazienti hanno sintomi B; 10-20% hanno PS scadente e/o fattori prognostici sfavorevoli.
- 20-40% dei pazienti hanno >1 sede extranodale (GI nei MALT)

Incidenza dei LNH indolenti

- In Italia, incidenza annua pari a circa 5-7/100.000 abitanti (M>F, razza bianca > nera) (USA, SEER ~ 8-9)
- L'incidenza è maggiore nelle fasce d'età avanzata
- Costante incremento temporale dell'incidenza
- Previsto un incremento dei pazienti da curare nei prossimi anni

I principali istotipi:
Linfoma Linfocitico /
Leucemia Linfatica Cronica

Linfoma linfocitico/LLC

Un linfoma (6-8%), costituito da piccoli linfociti B rotondi e monomorfi, mescolati con prolinfociti e paraimmunoblasti (centri di proliferazione)

ICD-O: CLL 9823/3 B-SLL 9670/3

NOTE CLINICHE

- Adulti: età mediana 65 anni
- Rapporto maschio-femmina = 21
- Linfadenopatia generalizzata ed epatosplenomegalia
- Frequente leucemizzazione (se >5000/mcl, diagnosi di LLC)

● IMMUNOFENOTIPO

- Sig dim (M o MD), CD20, CD5 e CD23+, e CD79b dim, CD38 +/-

● CITOGENETICA

- Q banding: tris 12q(20%), del 13q14 (40%)
- FISH: del 13q14(55%), del 11q22-23 (18%), trisomia 12q13(16%), del 17p13(7%)

● BIOLOGIA MOLECOLARE

- IgVH non mutati (derivazione da cellule B “naive”): 40-50%
- IgVH mutati (derivazione da cellule B “memory”): 60%

- **Prognosi:** decorso clinico indolente, ma malattia non curabile
 - Sopravvivenza mediana: 8-10 anni

Fattori prognostici sfavorevoli:

- Stadio (sec. Binet e Rai) avanzato
- Diffusa infiltrazione midollare
- Anomalie cromosomiche (delezioni 17p, delezioni 11q)
- Immunofenotipo: espressione di DC38
- Assenza di mutazioni IgVH
- Espressione ZAP 70

Sviluppo di linfoma di alto grado (s. di Richter): 4-15%

- Linfoma B diffuso a grandi cellule

Criteri di stadiazione clinica della leucemia linfatica cronica

Stadiazione secondo Rai (1975)⁴⁵

Stadio	Criteri clinici	Categoria rischio
0	linfocitosi nel sangue periferico e nel midollo osseo	basso
I	linfocitosi e linfadenopatie diffuse	intermedio
II	linfocitosi con splenomegalia e/o epatomegalia	intermedio
III	linfocitosi e anemia (Hb <11 g/dL) con o senza epato-spleno-linfoadenomegalie	alto
IV	linfocitosi e piastrinopenia (PP <100x10 ⁹ /L) con o senza anemia e/o epato-spleno-linfoadenomegalie	alto

Stadiazione secondo Binet (1981)⁴⁶

Stadio	Criteri ematologici	Criteri clinici
A	Hb ≥10g/dL PP ≥100.00 mm ³	<3 sedi interessate
B	Hb ≥10g/dL PP ≥100.000 mm ³	≥3 sedi interessate
C	Hb <10g/dL PP <100.000 mm ³	qualunque numero di sedi

Nota: la sopravvivenza mediana dei casi di LLC è strettamente correlata agli stadi secondo Rai e Binet

LLC e Linfoma linfocitico: la stessa malattia?

- La differenza fondamentale è nella presenza di conclamata leucemizzazione ($> 5000/\text{mcl}$). Nella LLC è più frequente la MEA e l'ipogammaglobulinemia.
- Si devono applicare le stesse valutazioni biologiche: analisi in FISH, stato mutazionale IgVh, ZAP70, p53 etc)
- Consigliabile utilizzare gli stessi protocolli terapeutici
- Si devono adottare gli stessi criteri per la valutazione della risposta terapeutica

I principali istotipi:
**Linfoma Plasmocitico /
Malattia di Waldenström**

LINFOMA LINFOPLASMATICO/M. WALDENSTROM

Neoplasia delle cellule B mature (1-2% dei LNH) costituita da piccoli linfociti, linfociti plasmacitoidi e plasmacellule, con presenza (in molti casi) di proteina sierica monoclonale (IgM>IgG) che può condizionare l'insorgenza di una sindrome da iperviscosita' o crioglobulinemia o da manifestazioni CM correlate.

E' il corrispettivo anatomo-patologico del morbo di Waldenstrom.

Frequente associazione con infezione da HCV.

ICD-O: 9671/3 9761/3

- Note cliniche:**
- eta' media: 65-70 anni
 - sesso maschile (2:1)
 - impegno clinico: midollo osseo (80%), milza (50%) linfonodi (30%)

- **Immunofenotipo** B antigenes+++ , IgM++ (a volte IgG+), CD5-, CD23-, cd10-, CD38+, CD43+/-
- **Genotipo:**
 - Delezioni di 6q21 (in FISH) nel 42% dei casi
 - Casi senza paraproteinemia: traslocazione t(9;14)(p13;q32) nel 30-50%
- **Sopravvivenza mediana:** 4-5 anni
- **Fattori prognostici sfavorevoli:**
 - anemia
 - incremento beta2-microglobulinemia
 - riduzione dell'albumina sierica



I principali istotipi:
Linfoma Follicolare

LINFOMA FOLLICOLARE

Un gruppo di linfomi che origina dalle cellule B del centro germinativo (centrociti e centroblasti) con pattern architettonico follicolare (almeno parzialmente).

ICD-O linfoma follicolare, NAS 9690/3

grado 1 9695/3

grado 2 9691/3

grado 3 9698/3

Note cliniche: Uno dei linfomi piu' frequenti: (22% circa - variabilità geografica: 35% in USA); 70% dei LNH indolenti.

Età mediana di circa 59 anni (raro sotto i 20 anni)

Rapporto maschio/femmina 1:1,7

Linfonodi (spesso mesenterici), midollo osseo (40-50%) e milza.

Quadro istopatologico

- pattern - follicolare (>75% follicolare)
 - follicolare e diffuso (25-75% follicolare)
 - minimamente follicolare (< 25% follicolare)

- grado (oculare con campo 18mm; ingrandimento 40x)
 - 1 0-5 centroblasti per hpf
 - 2 6-15 centroblasti per hpf
 - 3 >15 centroblasti per hpf
 - a) centrociti ancora presenti
 - b) solo centroblasti

Immunofenotipo:

AgB ++, CD10+, CD43- (rari casi - e +, grado 3),
CD5- e CD23-(cellule follicolari dendritiche
CD23+)

Citogenetica e biologia molecolare:

t(14;18) con riarrangiamento del gene Bcl-2
nel 50-95% (PCR e FISH);
riarrangiamento del gene Bcl-6 nel 15%

Fattori prognostici:

n° stazioni linfonodali, LDH, caratteristiche
istologiche, espressione Bcl-2

I principali istotipi:

Linfoma Marginale

Extranodale del M.A.L.T.

Nodale

Splenico

La famiglia dei Linfomi della zona marginale

- Marginali extranodali
 - MALT
 - Splenici
- Marginali nodali

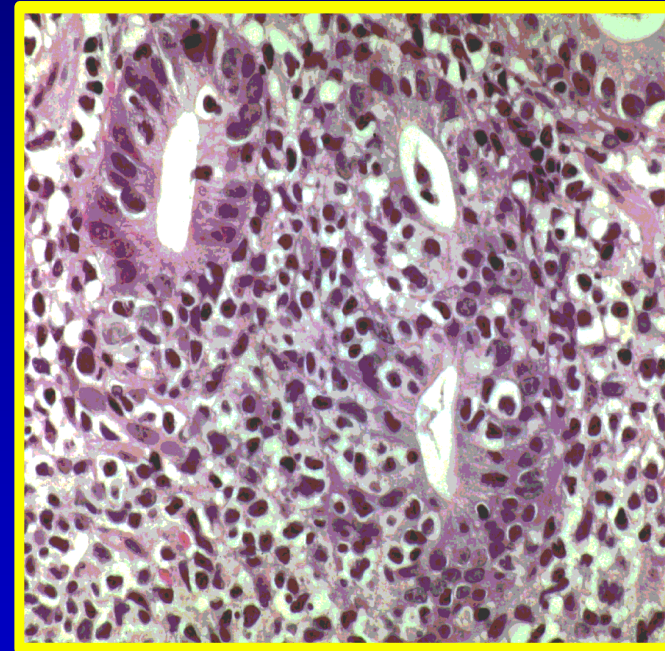
Prevalenza e definizioni

Terzo gruppo per frequenza (10%) tra i LNH B, dopo i LNH a grandi cellule e i LNH follicolari

- LZM extranodale di tipo MALT (7-8%, istotipo più frequente nei LNH extranodali, in particolare in sede gastrica e testa/collo)
- LZM splenico \pm linfociti villosi (1-2%)
- LZM nodale (1-2%)

Linfoma marginale extranodale

- 67% stage I and II
- 92% low to low-intermediate IPI score
- B-symptoms infrequent
- Involvement of several extranodal sites (stomach, head/neck, lung)
- Bilateral or multifocal involvement
- Prolonged natural history and favourable prognosis



Linfomi MALT

- **Fenotipo:** CD19, 20, 22, 79 +; CD5, 10,23 –
- **Cariotipo e genetica molecolare:**
 - t (11;18) (q21;q32) (30%),
 - t (14;18) (q32;q21) (20%, testa/collo, polmone, fegato coinvolgimento del gene MALT1),
 - t (1;14) (q22;q32) (3%, BCL-10)
- Correlazione con infezione da *H. Pylori* (90% nella localizzazione gastrica) e infezione da HCV
- Trasformazione in alto grado di malignità
- ICD-0 9699/3

Linfoma marginale splenico

Note cliniche

- Età mediana 50-60 aa; ratio M/F:1-1.7
- Altissima frequenza di localizzazione al midollo osseo (con localizzazione intrasinusoidale) e di impegno del sangue periferico (linfociti > 4000/mmc: 50-75%); frequente impegno epatico. La presenza di linfociti villosi nel sangue periferico è variabile da caso a caso e nel tempo nello stesso caso.
- Linfonodi addominali interessati nel 25% dei casi; raramente i linfonodi toracici e superficiali
- Leucemizzazione marcata (> 30.000/mmc) nel 20% dei casi, anemia, piastrinopenia e CM sierica nel 20-30% dei casi.
- ICD-O 9689/3

Fenotipo

Ag B +++, CD5, CD10 e CD103 -, Cd43 -, CD23 -/+

Genetica

Assenza di un marcatore specifico o ricorrente
(trisomia 3, perdita allelica 7q21-32)
mutazioni somatiche con eterogeneità intraclonale

Decorso clinico

Mediana di sopravvivenza 8-13 anni
Decorso sfavorevole in una minore% dei casi
(mutazioni p53)

Prognosi

Parametri prognostici sfavorevoli:
Età
Leucocitosi
Grado di anemia
Entità della splenomegalia

I principali istotipi: **Linfoma Mantellare**



Linfoma della zona mantellare

Neoplasia delle cellule B mature (3-10%) costituita da cellule linfoidi di dimensioni piccolo-medie, che morfologicamente assomigliano ai centrociti (con contorni nucleari meno irregolari) ad origine dalla zona mantellare

Circa 6,0% di tutti i linfomi.

ICD-O 9673/3

Note cliniche

Eta' mediana di 63 anni (range 39-83); M/F: 3:1

Molti pazienti si presentano con malattia in stadio avanzato

Sintomi B nel 50% dei pazienti all'esordio

Impegno clinico

Linfonodi

Milza

Midollo osseo (>50%)

Tratto G.I. (10-30%): poliposi multipla

Espressione leucemica nel 25-55%

Immunofenotipo

- Ag B +++, CD5+, CD23-, CD10-, CD11c-, CD43+, sIgM+, sIgD+ (60%), $\lambda > k$
- ciclina D1+ in immunoistochimica (overespressa per la t(11;14))

Citogenetica

t(11;14) (q13;q32)

varianti blastoidi: numero aumentato di cromosomiche (+3q,+7p,+12q;alterazioni delezioni 17p; amplificazioni di DNA in10p12-p13)

Genotipo

Riarrangiamento del gene Bcl-1 (PCR 40-50%; FISH: 80-90%)
Geni della regione variabile (IgVH) non mutati (origine da cellule "naive" pre-CG)

PROGNOSI MCL

- linfoma "aggressivo": sopravvivenza mediana = 3 anni
- risposta completa: 19%; risposta parziale: 46%
- meno del 10% sopravvivono a 5 anni
- prospettive molto migliori con HDST-Rituximab

fattori prognostici sfavorevoli:

- elevato indice mitotico (o Ki67)
- varianti blastoidi
- iper-espressione di p53
- espressione (RNAm) di ciclina D1
(Rosenwald et al.: Cancer cell 3: 185-197, 2003)

I principali istotipi:
Micosi Fungoide



Micosi fungoide/Sézary syndrome

- Coinvolge la cute e si manifesta con lesione di vario tipo.
- Presenza di cellule T di piccola e media taglia che si infiltrano nel derma e nell'epidermide e dotate di nuclei cerebriformi.
- **ICD-O 9700/3**
- Stadiazione differente da quella dei linfomi
- Età mediana di 60 anni.
- Terapie utilizzate: applicazione di farmaci, di radiazioni ionizzanti o ultraviolette (PUVA), CT e/o interferone in caso di malattia estesa.

Stadiazione della micosi fungoide

- stadio I:** chiazze eritematose o placche con infiltrazione cutanea di minima entità
- stadio II:** papule o placche eritematose con infiltrazione cutanea di entità moderata, in genere associate a chiazze eritematose
- stadio III:** formazione di noduli tumorali in genere associati a papule, placche o lesioni eritematose
- stadio IV:** una o più lesioni sopradescritte associate a linfadenomegalia
- stadio V:** una o più lesioni sopradescritte associate a linfadenomegalia e interessamento viscerale

I principali istotipi: **Linfomi aggressivi**



Linfomi aggressivi

LNH aggressivi sono un gruppo di almeno 10 entità distinte; esse includono principalmente:

1. Diffuse large B-cell Lymphoma
2. Peripheral T-cell Lymphoma
3. Anaplastic large cell Lymphoma T/null cell

A queste entità vanno ne vanno aggiunte altre 2 che, per comportamento clinico aggressivo, possono essere assimilate ai “classici” LNH aggressivi:

1. Follicular non-Hodgkin Lymphoma, grade III
2. Mantle cell Lymphoma

Linfoma diffuso a grandi cellule B

- Istotipo di LNH più diffuso (30-35%)
- Controparte normale: Cellula B matura proliferante
- Età mediana di circa 65 anni
- Rapporto maschio/femmina 1.2
- Nel 40% dei casi ha una presentazione extranodale: tratto GI, tessuti molli, osso, testicolo, ghiandole salivari, tonsille, SNC. Rara la leucemizzazione
- Decorso clinico aggressivo, spesso presentazione bulky

Linfoma diffuso a grandi cellule B

IMMUNOFENOTIPO

- Ag B ++(a volte difettivi), sIg/CyIg 50-75% dei casi: IgM> IgG> IgA (pattern variabile); CD30 + negli anaplastici e mediastinici (dim); CD5+ (10 %), CD23-, CD10 (25-30%), CD138 occasionalmente.
- espressione nucleare bcl6+, bcl2 (30-50%)
- indice proliferativo (Ki-67) >40%

CITOGENETICA

- Traslocazione t(14;18) (q32;q21) con riarrangiamento del gene bcl2: 20-30%
- Anomalie del 3q27 con coinvolgimento del gene bcl-6: 30%
- Iperdiploidia, +9p nei primitivi mediastinici

Linfoma diffuso a grandi cellule B

GENOTIPO

- Geni delle immunoglobuline: riarrangiamento clonale dei geni delle catene pesanti e leggere; estese mutazioni somatiche con eterogeneità clonale dei geni della regione variabile (derivazione da cellule centrofollicolari)

Oncogeni:

- gene BCL2: riarrangiamento nel 20-30%
- gene BCL6: riarrangiamento nel 30%
- EBV: frequente nelle forme di immunodeficienza (es. PTLD)

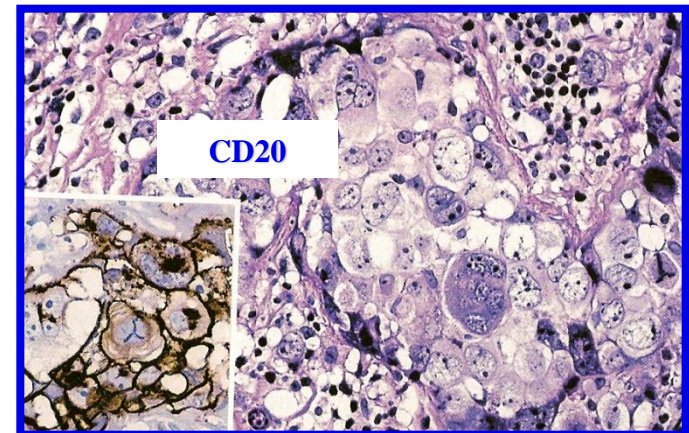
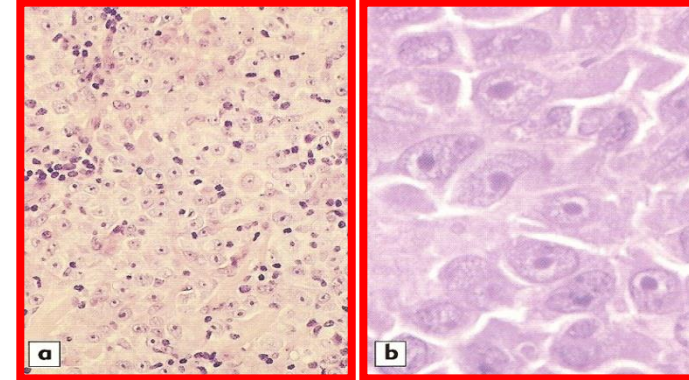
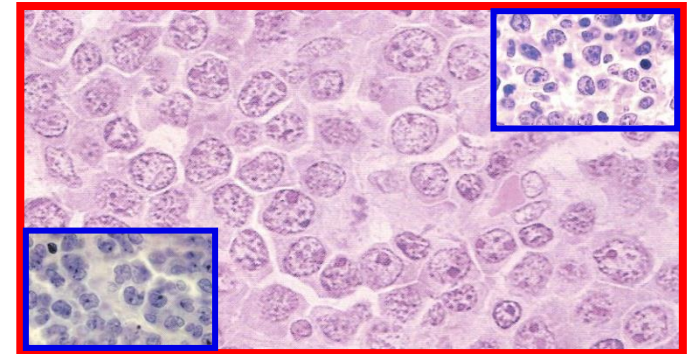
Linfoma diffuso a grandi cellule B

PATTERN istopatologico

❑ centroblastico: da medie a larghe cellule con nucleo ovale a rotondo, con cromatina fine e 2-4 nucleoli, citoplasma scarso, spesso basofilo. Variante monomorfa e polimorfa a volte con aspetti multilobati.

❑ immunoblastico: netta prevalenza di larghe cellule nucleolo singolo centrale, e un citoplasma abbondante intensamente basofilo.

❑ anaplastico: cellule molto grandi, poligonali, con bizzarri nuclei polimorfi (simil RS). Pattern coesivo, a volte, sinusoidale (molto frequentemente di origine T).



Linfoma diffuso a grandi cellule B

Nella classificazione REAL era una variante del LNH a larghe cellule mentre nella WHO è una forma a sé stante

- Cellula di Origine: Ly B timico
- Morfologia: marcata fibrosi che crea comparti nei quali sono presenti larghe cellule linfomatose, residui timici, linfociti residui ed eosinofili; possibile presenza di cellule Reed-Stenberg-like
- Immunofenotipo: Cellule B mature, spesso assenti slg. Spesso CD30+ e CD45-
- Genetica: Dimostrabile riarrangiamento Ig; BCL-2, BCL-6,MYC NEG
- Clinica: 30-40 aa, lieve predominanza femminile; spesso esordisce con malattia localmente invasiva condizionante sindrome della vena cava superiore (fattori prognostici negativi come bulky ed effusione pleurica). Le recidive tendono ad essere EXTRANODALI (fegato, intestino, reni, ovaie, SNC)

Linfoma diffuso a cellule T periferico

I LNH a cellule T periferiche sono un gruppo eterogeneo di neoplasie a decorso aggressivo, che costituiscono, nel loro insieme, meno del 15% di tutti i LNH.

In ordine decrescente di frequenza fanno parte di questo gruppo:

- Peripheral T cell-Lymphoma unspecified
- Anaplastic large cell Lymphoma primary systemic type (ALCL)
- Angioimmunoblastic T cell-Lymphoma
- Extranodal NK/T cell-Lymphoma
- Subcutaneous panniculitis-like T cell-Lymphoma
- Enteropathy-type T cell-Lymphoma
- Hepatosplenic gamma/delta T-cell Lymphoma

Linfoma a cellule T periferico

- **Normale controparte:** Cellule T periferiche in vari stadi di trasformazione
- **Clinica:** Linfoma aggressivo, che può essere accompagnato da manifestazioni meno tipiche dei LNH B, come coinvolgimento della cute, sindrome emofagocitica, segni di “attivazione” immunologica come palemocitosi, ipergammaglobulinemia, fenomeni autoimmuni (prevalentemente LNH angioimmunoblastico: anemia emolitica, vasculite, poliartrite, disordini della tiroide)
- **Prognosi:** peggiore rispetto ai LNH B. Rischio di comparsa di LNH a larghe cellule B EBV correlati.

Linfoma anaplastico a grandi cellule T e Null

a) PRIMITIVAMENTE CUTANEO

(in pazienti senza precedente anamnesi di sindromi linfoproliferative e senza evidenza di malattia sistemica):

- ❖ La **MAGGIOR PARTE** sono t(2;5) (ALK) negativi; generalmente sono linfomi localizzati, prognosi favorevole con lunghe remissioni e sporadiche remissioni spontanee.
- ❖ 25% dei pazienti evolve verso una forma sistemica

Linfoma anaplastico a grandi cellule T e Null

b) PRIMITIVAMENTE SISTEMICO

(non limitato alla cute):

- ❖ NB Variante Hodgkin's Like
- ❖ 40-60% portatori di t(2;5)
- ❖ Andamento clinico aggressivo ma potenzialmente curabile, con sopravvivenze paragonabili ai DLBCL nei pazienti ALK NEG, mentre significativamente migliori nei pazienti ALK POS

I principali istotipi: **Mieloma multiplo**

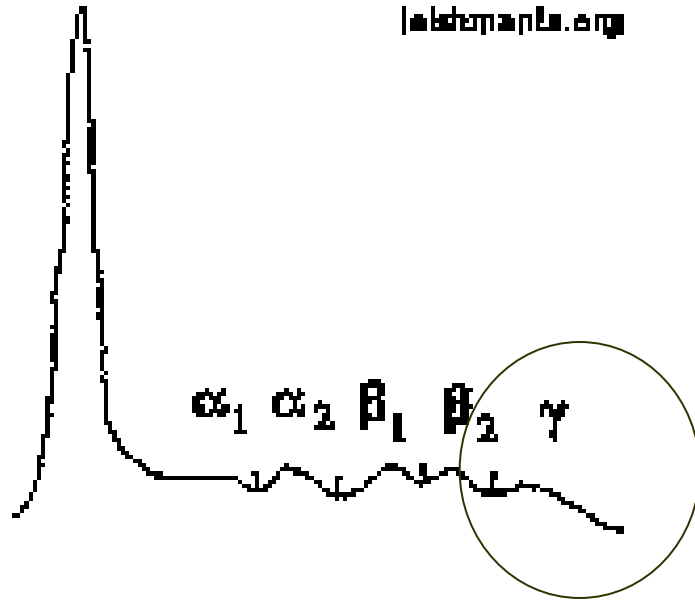


Mieloma multiplo

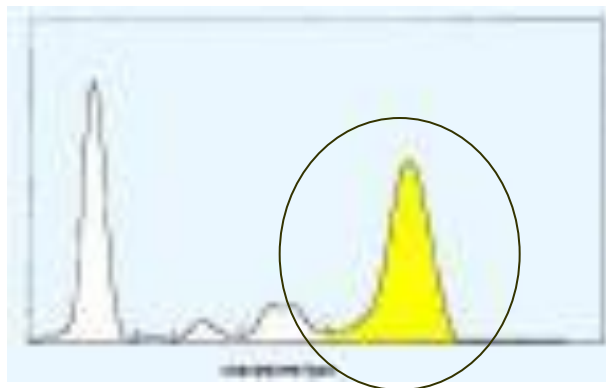
DEFINIZIONE:

Malattia tumorale a elettiva localizzazione del midollo osseo, dovuta alla proliferazione di un singolo clone plasmacellulare, che produce, nel 90% dei casi una elevata quantità di una immunoglobulina monoclonale (> IgG e IgA), documentabile nella maggioranza dei casi all'esame elettroforetico delle proteine sieriche

labdumanla.org



**Elettroforesi delle
proteine sieriche
normale**



**Mieloma (picco
monoclonale in
zona gamma)**

Varianti cliniche

- Mieloma multiplo
- Mieloma non secernente
- Mieloma micromolecolare (catene leggere k/λ)
- Mieloma non secernente non produttore
- Plasmocitoma solitario dell'osso o plasmocitomi a sede extra-midollare
- Leucemia plasmacellulare

Stadiazione

1. Esami di laboratorio

- Emocromo
- Dosaggio Ig siero e urine
- Dosaggio catene leggere κ/λ siero e urine (proteinuria di Bence Jones)
- Funzionalità renale
- Calcemia
- PCR
- Beta 2 microglobulina

2. Esami strumentali

- Rx scheletro in toto

3. Biopsia osteomidollare (BOM)

Diagnosi differenziale tra MM e MGUS

	MM	MGUS
Infiltrazione plasmacellulare midollare	> 10%	< 10%
Paraproteina sierica		IgG < 2 g/dl IgA < 1 g/dl
Proteinuria di Bence Jones	> 50% casi	rara
Lesioni osteolitiche	Spesso presenti	Assenti
Sintomi	Frequenti	Assenti
Anemia	Frequente	Assente
Ipercalcemia	Può essere presente	Assente
Alterazioni della funzionalità renale	Possono essere presenti	Assenti

MGUS, Mieloma multiplo e altre condizione: diagnosi differenziale

Variabile	MGUS	Mieloma smouldering	Mieloma multiplo	Macroglobulinemia di Waldenström	Amiloidosi primaria
plasmacellule midollari (%)	<10	≥10	≥10	>10 (cellule linfoplasmocitoidi)	<10
proteina monoclonale circolante (g/dL)	e <3	e/o ≥3	e/o ≥3	e >3	e <3
manifestazioni cliniche	assenti	assenti	presenti*	presenti*	presenti*

**segni clinici presenti secondo la patologia di base*

Classificazione secondo Durie e Salmon (1988) (I-III; A-B)

STADIO	Hb g/dl	Ca mg%	Lesioni scheletriche	IgG(g/dl)	IgA (g/dl)	Bence Jones (g/24 ore)
I (tutti i criteri)	> 10	Normale	0 o 1 singola	< 5	< 3	< 4
II (nessuno dei criteri del I o III stadio)						
III (1 o più criteri)	< 10	> 12	Lesioni multiple	> 7	> 5	> 12

A	Funzionalità renale nella norma
B	Insufficienza renale