

Diagnostica ematologica

Come si analizzano le cellule patologiche?

I tre dati fondamentali per identificare una cellula sono: aspetto morfologico, fenotipico e genetico.

1. **Aspetto morfologico**: Se abbiamo un campione di sangue, di midollo o di un essudato che contiene cellule linfomatose si fa uno striscio o un citocentrifugato, si guarda al microscopio e si può già individuare quali tipi cellulari sono presenti nel campione. Successivamente, se non c'è chiarezza morfologica, si studia il fenotipo delle cellule patologiche. Alcune cellule sono facilmente riconoscibili, ad esempio granulocita neutrofilo o plasmacellula, ma su quelle mononucleate che non hanno granuli o altre caratteristiche particolari ci possono essere dei dubbi soprattutto se sono presenti in quantità aumentate nel sangue. Ad esempio se abbiamo una linfocitosi è difficile capire dallo striscio se sono T, B, se sono normali o patologici, se sono dei blasti (e in quel caso di quale linea cellulare) ecc.

2. **Aspetto fenotipico**: gli antigeni che si vanno a studiare sono principalmente antigeni di membrana, antigeni citoplasmatici e raramente nucleari.

• Il fenotipo si può studiare in **citofluorimetria** se abbiamo le cellule in sospensione.

Queste vengono marcate con anticorpi che vanno a legarsi a diverse molecole. Gli anticorpi sono poi marcati con dei fluorocromi e quindi il sistema di rilevazione rileva i diversi segnali emessi e in base a questo sappiamo se si sono legati o meno. Su una stessa cellula si può studiare, in contemporanea, la presenza o meno di 5-8 molecole (Questo è un grande vantaggio della citofluorimetria, perché si studiano contemporaneamente più antigeni su molte cellule, quindi la percentuale che si ottiene di positività è molto valida. Sensibilità molto maggiore di remissività in caso es di leucemia). Questo ci fornisce alcune caratteristiche della cellula che servono per capire che tipo di cellula è e il livello di aberrazione di questi antigeni, di conseguenza sappiamo la patologia a cui appartengono le cellule in esame. I tumori del sistema linfatico sono maggiormente sostenuti dalla linea B. La **clonalità** (presupposto obbligatorio ma non sufficiente per determinare un profilo neoplastico) nelle cell B è molto facile da definire con una tecnica immunofenotipica perché nel loro assetto, le cellule B contengono immunoglobuline di membrana specifiche che fanno da recettore. Queste immunoglobuline sono costituite da catene pesanti (IgG o IgM) e dalla catena leggera che può essere kappa o lambda; se c'è un clone c'è una restrizione di catena leggera sulle immunoglobuline di membrana, quindi quel clone monta solo una catena leggera o kappa o lambda. Se invece c'è una linfocitosi reattiva, quindi c'è un aumento reattivo a seguito di una patologia infettiva in atto, il rapporto kappa-lambda è mantenuto. Con un esame citofluorimetrico possiamo capire se sono clonali o meno anche in caso di modesto aumento dei linfociti. Possiamo quindi capire se è una linfocitosi reattiva oppure no. Questo esame non è possibile nella linea T. I linfociti T si riconoscono perché esprimono alcuni antigeni di membrana ma non c'è questo concetto di clonalità che si può rilevare con il fenotipo. Bisogna studiarla con tecniche di biologia molecolare.

• **L'immunoistochimica**, invece, si fa su sezione di paraffina trattata per far sì che sveli alcuni antigeni. Si mette l'anticorpo che viene rilevato da un altro anticorpo anti-anticorpo colorato con enzimi (perossidasi) e se si colora in un certo modo vuol dire che l'anticorpo si è attaccato alla cellula. Le due tecniche andrebbero fatte insieme.

Gli SCOPI della citofluorimetria sono:

a. caratterizzazione e quantificazione del clone

- b. identificare delle reattività aberranti
- c. studio del profilo immunofenotipico
- d. monitoraggio di malattia (malattia minima residua).

Nelle forme T linfoproliferative la clonalità non è realizzabile mediante CFM (vedi rapporto k/lambda per le cellule B). Nella maggior parte dei casi le cellule T non esprimono un profilo immunofenotipico peculiare, tale che non possa essere evidenziato anche in forme di linfocitosi reattive o di virosi.

Cosa non si dovrebbe chiedere alla CFM:

- diagnosi di linfoma di Hodgkin: la CFM non individua la cellula di Reed-Sternberg (per la mancanza di un profilo immunofenotipico peculiare e per la fatalità sul tessuto determinata dalla sua manipolazione meccanica per la CFM);
- studio del fenotipo delle leucemie della serie mielo-monocitica croniche
- lo studio di malattia residua su campione midollare in presenza di evidenze di malattia nel sangue periferico.

Cluster di differenziazione cellulare CD:

= *antigeni cellulari (spesso di membrana) riconosciuti da specifici set di anticorpi monoclonali.*

Servono ad identificare:

- tipo di cellula
- stadio di differenziazione
- attività della cellula

Sono 339 quelli attualmente conosciuti, per i quali c'è un anticorpo specifico. Quindi noi abbiamo un certo numero di CD che andiamo a studiare nelle patologie ematologiche: leucemie acute e sindromi linfoproliferative (circa 60% delle patologie oncoematologiche).

Oltre ai marcatori di linea e di stato differenziale della cellula, ci sono anche dei **marcatori utili per definire l'im maturità della cellula** (TdT, CD34, CD117, CD1a)—> indicano una patologia della cellula staminale. Sono marcatori di leucemia acuta, mieloide o linfoide (tranne CD1a che è solo per la serie linfatica). Nei vari stati maturativi della serie mieloide si accendono e si spengono alcuni marcatori.

Marcatori pan-mieloidi: CD33 e CD13 e la mieloperossidasi. La presenza di uno di questi tre ci dice che siamo di fronte ad una cellula mieloide.

Marcatori PAN-B: la presenza dei marcatori PAN-B linfocitari CD 19 e 79a ci indica la presenza di una cellula linfatica.

Marcatori per la linea T-linfatica: Dei marcatori simili ci sono anche per la linea T in cui i marcatori forti sono CD3 e CD7 (che compare molto precocemente).

Marcatori per la serie eritroide: GPO

Il significato dei marcatori:

- definire la linea (esistono marcatori di linea forti che appaiono precocemente),
- lo stato di maturazione della cellula (con la presenza anche di marcatori molto immaturi che hanno significato di leucemia acuta),
- di espressione aberrante: quindi se si trova una popolazione cellulare che esprime insieme marcatori B e T, sono cellule patologiche

Pannelli: esistono una serie di pannelli con vari marcatori da testare e questi sono importanti per definire il tipo di patologia. Esiste un pannello per la serie linfatica B, esiste un pannello di marcatori patologici (circa 15) per la linea T e per le leucemie acute della serie mieloide.

3. Citogenetica: si basa sull'analisi della mappa cromosomica (*bandeggio cromosomico*). Si fa ancora in diagnostica prenatale. La citogenetica ha, però, dei limiti perché identifica anomalie "grossolane" e per fare questo tipo di esame le cellule devono essere in metafase, quindi devono essere indotte a proliferare, ma alcune patologie sono a basso profilo proliferativo. Questo test è stato un po' superato perché con il sequenziamento dei vari geni si è capito quali erano le alterazioni ricorrenti; questo ha fatto sì che si potessero preparare sonde specifiche da utilizzare sul preparato per capire se c'è stata una delezione, una traslocazione ecc di quella specifica sequenza genica e grazie a questo si può fare diagnosi anche su cellule in interfase. Tuttavia ci sono delle alterazioni che si possono identificare con la mappa cromosomica ma è comunque abbastanza lenta e poi non serve per la malattia residua perché bisogna avere un certo numero di cellule patologiche.

Sono state perciò trovate altre tecniche:

- PCR: permette di identificare se c'è una sequenza di DNA patologica all'interno di un gruppo di cellule con una sensibilità molto elevata. Queste funzionano quando c'è un prodotto di fusione o un gene anomalo, porzione che non è presente nel DNA normale. Molto utile nella diagnostica di malattia residua.
- tecniche di studio di mutazioni specifiche: tecniche di sequenziamento grazie alle quali si può individuare la mutazione di una specifica base azotata.
- tecnica di espressione genica del tumore: serve a sapere esattamente quali geni sono alterati in un determinato tumore.