

Scientific Papers

Contributi Scientifici



Associazione Tecnico Scientifica – S.I.T.La.B.

Algoritmo Fenotipico (CD10 BCL6 MUM1) nel Linfoma a Grandi Cellule B Diffuso

Evelyn Finco (Padova); Natalina Marchi (Padova); Saverio Stanziale (Padova);

SITLaB news

Publicato: 24 luglio 2018

Copyright: © SITLaB –

1. Introduzione

I linfomi costituiscono un gruppo eterogeneo di neoplasie che originano da cellule immunologicamente attive. Sono definiti come neoplasie maligne solide del sistema linfopoietico, in cui si ha la proliferazione monoclonale di linfociti trasformati in fasi diverse di maturazione (a seconda del tipo di linfoma) a livello tissutale (linfonodi o stazioni extra-nodali), e fanno parte della più grande classe di Neoplasie Linfoidi o Malattie Linfoproliferative Maligne assieme alle leucemie linfoidi, viste invece in passato come patologie non correlate fra loro. E' stato riscontrato infatti, tramite analisi citologiche ed immunoistochimiche che molte leucemie e linfomi sono identici dal punto di vista di clone mutato e che cambia solo la sede iniziale di colonizzazione neoplastica (Midollo Osseo per la leucemia/Linfonodo per il linfoma) (1). I linfomi maligni rappresentano il quinto tipo di tumore per frequenza nel mondo occidentale, con una incidenza pari a circa 19-20 casi per 100.000 abitanti. L'incidenza è ampiamente influenzata da fattori geografici razziali e temporali ed è superiore nei paesi industrializzati, nei soggetti di sesso maschile e di razza bianca. Dopo una fase epidemica che nei paesi occidentali ha portato ad un incremento dei casi linfoma del 50% circa dagli anni '70 agli anni '90', numerosi studi concordano sul fatto che l'incidenza delle malattie linfoproliferative si sia attualmente stabilizzata o registri solo incrementi minori (2). Storicamente i linfomi sono distinti in due grandi categorie: i Linfomi (o Morbo) di Hodgkin e i Linfomi Non-Hodgkin. Ancora oggi questa suddivisione è molto utile ed utilizzata universalmente perché identifica e separa dalle altre neoplasie linfatiche. Sono tra le neoplasie più studiate, a causa della loro elevata incidenza e per la loro estrema variabilità. Costituiscono il 5% dei tumori maligni e la quinta causa di morte per cancro. La prevalenza è costantemente in crescita e si stima che ogni anno vengano diagnosticati 16.000 nuovi casi di linfoma con un incremento annuo pari all'1,3%

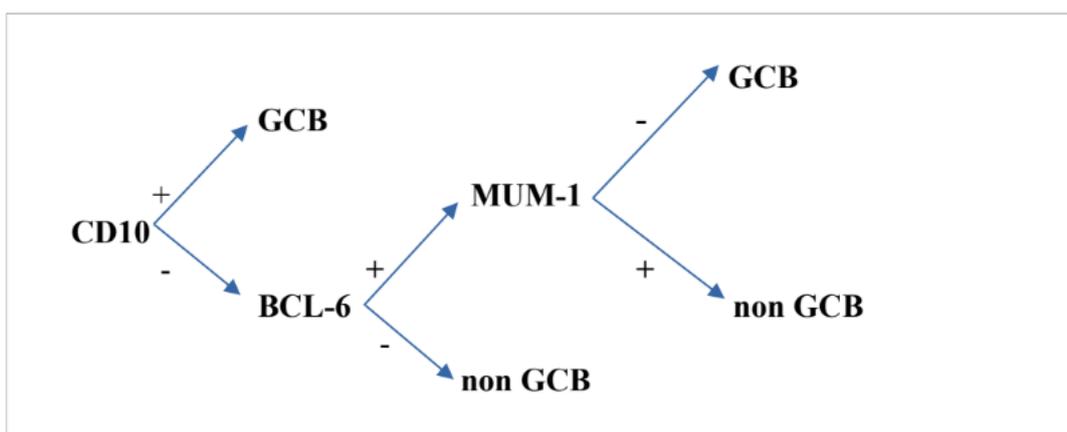
2. Obiettivo della ricerca

Lo scopo di questa ricerca è quello di determinare il sottotipo molecolare di linfoma a grandi cellule B diffuso in modo da permettere ai clinici di determinare quali pazienti avrebbero una ridotta possibilità di remissione dopo terapia standard e suggerire, quindi, chi possa essere candidato ad un trattamento più aggressivo.

L'utilizzo, però, di tecniche come c-DNA (3,4) ed oligonucleotidi microarrays (5), non sono utilizzate di routine in tutti i laboratori perché presentano costi elevati e personale qualificato. Quindi è necessario, per poter sotto classificare il DLBCL in gruppi prognosticamente distinti, ricorrere a metodiche più semplici come l'immunoistochimica, tecnica con più ampia diffusione e generalmente utilizzata nella pratica clinica rispetto a tecniche di biologia molecolare.

Il GCB DLBCL esprime un profilo fenotipico simile a quello delle cellule B normali del centro germinativo (CD10+; Bcl-6+; CD138+) (6); mentre il non- GCB DLBCL è caratterizzato da un assetto antigenico simile a quello indotto durante l'attivazione in vitro di cellule B periferiche (MUM1/IFR4+; CD138+) (6). Sia CD10 che Bcl-6 sono considerati markers del centro germinativo, mentre MUM-1/IFR4 è espresso da plasmacellule ed in un sottotipo cellulare nella zona chiara del centro germinativo. In alcuni studi è stata valutata, su tissue microarray, l'espressione immunoistochimica di CD10, Bcl-6 e MUM-1 (7). Questi tre markers, reattivi in tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina, sono differentemente espressi in GCB e non-GCB DLBCL, quindi i sottogruppi GCB e non-GCB di DLBCL possono essere accuratamente differenziati usando un pannello immunofenotipico costituito soltanto da questi tre markers (7,8).

Figura n.1 Algoritmo fenotipico.



Dato che CD10 e Bcl-6 sono markers delle cellule B del centro germinativo, quando CD10 soltanto o CD10 e Bcl-6 sono positivi, i pazienti sono assegnati al gruppo GCB; quando, invece, entrambi gli anticorpi sono negativi i pazienti sono automaticamente assegnati al gruppo non-GCB. Nell'eventualità in cui CD10 è negativo, mentre Bcl-6 è positivo, l'espressione di MUM-1 determina il gruppo: se MUM-1 è negativo il paziente è assegnato nel gruppo GCB; al contrario, quando c'è positività di quest'ultimo il paziente è assegnato al gruppo non-GCB (figura 1) (9).

3. Materiali e Metodi

Al fine di soddisfare lo scopo della tesi sono stati selezionati 13 casi di linfoma pervenuti presso il servizio di Anatomia Patologica Ospedale Riuniti Padova Sud ULSS 6 Euganea.

Sono stati esaminati 13 casi di pazienti maschi e femmine di età media 65,8 anni.

Su tutti i casi sono state eseguite le seguenti indagini:

Istochimiche

1. Colorazione con Ematossilina ed Eosina
2. Colorazione secondo Giemsa
3. Colorazione all'Acido Periodico di Schiff (PAS)
4. Colorazione del reticolo (metodo secondo Gomori)

Immunoistochimiche

1. CD 10
2. BCL 6
3. MUM 1

Colorazione con Ematossilina ed Eosina

L'ematossilina è una sostanza vegetale che viene estratta dal legno di campeggio (*Haematoxylon campechianum*). Non è di per sé un colorante, ma diventa tale per ossidazione ad emateina. Trattandosi di colorante basico, questo ha affinità per le sostanze acide, ossia basofile. Si spiega così come esso colora in blu violaceo i nuclei, la mucina e le sostanze fondamentali dei connettivi ad alto tenore di mucopolisaccaridi, come la matrice cartilaginea. L'eosina, che è un derivato dell'anilina e viene usata come colorante di contrasto, è un colorante acido che tinge in rosa la maggioranza delle strutture citoplasmatiche e, in generale, tutte le sostanze basiche, quindi acidofile, non rivelate dall'ematossilina.

La colorazione di Ematossilina-Eosina per sezioni istologiche viene effettuata di routine in modo automatico tramite il coloratore della LEICA XL AUTOSTEINER (programma n° 1) e manualmente in caso di non funzionamento del coloratore. La colorazione di ematossilina-eosina è stata modificata e standardizzata per il coloratore automatico secondo il seguente schema:

STAZIONE	VASCHETTA	TEMPO	REAGENTE
1	1	10 MIN	CHIARIFICANTE K-clear
2	2	5 MIN	CHIARIFICANTE K-clear
3	3	3 MIN	ALCOOL DENATURATO 99,9%
4	5	2 MIN	ALCOOL DENATURATO 95%
5	13	1 MIN	ALCOOL DENATURATO 50%
6	W1	2 MIN	ACQUA CORRENTE
7	7	2 MIN	EMATOSSILINA
8	W2	5 MIN	ACQUA CORRENTE
9	6	1 MIN	ALCOOL ACIDO
10	W3	2 MIN	ACQUA CORRENTE
11	8	5 MIN	EOSINA G
12	9	1 MIN	ALCOOL DENATURATO 95%
13	10	1 MIN	ALCOOL DENATURATO 99,9%
14	11	2 MIN	ALCOOL DENATURATO 99,9%
15	12	3 MIN	CHIARIFICANTE K-clear
16	USCITA		CHIARIFICANTE K-clear

Vengono utilizzati i prodotti disponibili in commercio: Ematossilina = Emallume Soluzione, Eosina G, in soluzione acquosa al 2% (soluzione di lavoro: Eosina al 2% 6 ml in 450 ml di acqua distillata che viene acidulata con l'aggiunta di n° 8 gocce di acido acetico glaciale. Alcool Acido = Alcool 70% su 2 litri si aggiungono da 0,5 di

acido cloridrico concentrato 37%. Alcool 99,9% di qualsiasi ditta, gli alcoli 50%, 80%, 95% sono ottenuti dalla diluizione dell'alcool denaturato 99,9%. Chiarificante K-clear.

Risultati

I nuclei sono colorati in varie tonalità di blu, mentre il citoplasma in varie tonalità di rosa.

Colorazione secondo Giemsa

La colorazione di Giemsa si basa sulla differenziazione dei costituenti cellulari che hanno reazione basica, i quali fissano l'eosina (acida) colorandosi in rosso- arancio. Gli altri componenti cellulari aventi reazione acida si colorano in blu, con i prodotti di ossidazione del blu di metilene azzurri (basici).

Trattasi di colorazione manuale che prevede i seguenti passaggi:

- “Sparaffinare” le sezioni e portarle all'acqua distillata;
- porre le sezioni per 60' in una soluzione di GIEMSA (20ml soluzione GIEMSA +80ml acqua distillata);
- differenziare con acido acetico diluito (0,4ml acido acetico glaciale +100ml acqua distillata) per pochi secondi;
- differenziare con alcool etilico 96°, controllando al microscopio;
- disidratare in alcool 100°
- chiarificare con K-clear;
- montare vetrino su Eukitt e coprioggetto.

Vengono utilizzati i prodotti disponibili in commercio e/o così preparati: Soluzione di Giemsa: colorante composto da azzurro A e B eosina giallastra, blu di metilene, acido acetico

Risultati

Il DNA e l' RNA appaiono colorati di blu, le sostanze acidofile di rosso-arancio, i proteoglicani acidi di rosso-violetto.

Colorazione all'Acido Periodico di Schiff (PAS)

La colorazione PAS viene principalmente utilizzata per colorare strutture contenenti alte quantità di carboidrati, come glicogeno, glicoproteine, proteoglicani tipicamente presenti nei tessuti connettivi e mucosi e sulle membrane basali. Il metodo si fonda sul seguente principio: i polisaccaridi (semplici e mucopolisaccaridi), quando ossidati a mezzo dell'acido periodico, danno origine ad aldeidi. I gruppi aldeidici vengono quindi rivelati istologicamente a mezzo del reattivo di Schiff (acido bis-N-amino solfonico).

Questo consta di fucsina basica (di colorito rosso) trattata con un eccesso di acido solforico che la rende del tutto incolore (leucofucsina). Peraltro, quando viene a trovarsi in presenza di gruppi aldeidici, essa dà luogo ad un'intensa reazione rossa o rosa-violacea (rosso magenta). Quindi, in definitiva, le strutture contenenti polisaccaridi assumono tale colorazione.

La colorazione manuale prevede i seguenti passaggi:

1. Sparaffinare le sezioni e portarle all'acqua distillata;
2. Trattare per 10 minuti in una soluzione di Acido Periodico all'1%;
3. Lavare con acqua corrente per qualche minuto;
4. Eseguire passaggio in acqua distillata;
5. Trattare per 15-30' con reattivo di Schiff;
6. Lavare in acqua corrente per 10 minuti;
7. Eseguire passaggio in acqua distillata;
8. Trattare per 1-2' in Ematossilina di Mayer;
9. Lavare in acqua corrente;
10. Eseguire passaggio veloce in una soluzione di alcool-acido (2 litri di alcool 70° +10 ml di acido cloridrico concentrato);
11. Lavare in acqua corrente per qualche minuto;
12. Disidratare secondo la serie di alcool 95°-100°;
13. Chiarificare in k-clear;
14. Montare vetrino con Eukitt e coprioggetto.

Vengono utilizzati i prodotti disponibili in commercio e/o così preparati: Acido Periodico 1% sale ditta Merck; Reattivo di SCHIFF (liquido ditta Merck incolore costituito da fucsina basica, acido cloridrico e metabisolfito di sodio).

Ematossilina: Emallume (sostanza di origine vegetale di colore giallastro).

Risultati

Le sostanze PAS positive (glicoproteine, glicogeno, etc.) si colorano di rosso Magenta.

Colorazione del reticolo (metodo secondo Gomori)

E' una colorazione elettiva per le fibre connettivali reticolari, che appaiono in nero intenso su un fondo aspecifico che va dal grigio al giallino pallido. Si basa sull'affinità dell'argento per le proteine costituenti queste fibre. La colorazione sec. Gomori viene modificata dalla nostra UOC rispetto a quella standard del Melis secondo la seguente procedura:

Trattasi di colorazione manuale che prevede i seguenti passaggi:

1. Sparaffinare le sezioni e portarle all'acqua distillata
2. Potassio permanganato 0,5% 5 minuti;
3. Lavaggio in acqua di fonte passaggi
4. Lavaggio in acqua passaggi
5. Potassio metabisolfito 3% 1 minuto;
6. Lavaggio in acqua di fonte 10 minuti;
7. Lavaggio in acqua distillata passaggi
8. Allume ferrico 2% 1 minuto;
9. Lavaggio in acqua di fonte 7-8 minuti;
10. Lavaggio in acqua passaggi;
11. Preparazione soluzione di Gomori:
12. Soluzione acquosa di Argento Nitrato 10% 5 ml;
13. Idrossido di Sodio 10% 1 ml;
14. Sciogliere il precipitato scuro formatosi aggiungendo 1ml di Ammoniaca al 25% aggiungere qualche goccia mescolando finché la soluzione diventa limpida (1ml);
15. Aggiungere 4-5 gocce di Argento Nitrato;
16. Raddoppiare il volume della soluzione con acqua distillata;
17. Filtrare la soluzione di Gomori così preparata e porre sulla sezione 2-4' controllando che al bordo del vetrino si formino delle "bollicine" grigiastre;
18. Lavaggio in acqua di fonte 7-8 minuti;
19. Formalina 10 % 5 minuti;
20. Lavaggio in acqua di fonte passaggi
21. Lavaggio in acqua distillata passaggi;
22. Potassio metabisolfito 1% 1 minuto;
23. Lavaggio in acqua di fonte passaggi
24. Lavaggio in acqua distillata passaggi;
25. Sodio Tiosolfato 1% 1 minuto;
26. Lavaggio in acqua di fonte; passaggi
27. Disidratare secondo la serie degli alcoli; passaggi
28. Chiarificare con K-clear
29. Montare vetrino con Eukitt e coprioggetto.

Vengono utilizzati i prodotti disponibili in commercio e/o così preparati:

Potassio Permanganato sale,; Potassio metabisolfito sale; Allume ferrico sale,; Argento Nitrato sale,; Idrossido di sodio sale,; Formalina 10%, formalina neutra tamponata; Sodio Tiosolfato sale.

Risultati

Le fibre reticolari si colorano di nero, le fibre collagene di bruno-violetto.

Immunostochimica

Nelle nostre indagini sono state allestite sezioni dello spessore di 3µm per l'analisi immunostochimica ottenute da campioni contenenti neoplasia e tessuto sano inclusi in paraffina e fissati in formalina neutra tamponata al 10 % .

La tecnica di colorazione immunostochimica consente la visualizzazione dell'antigene mediante l'applicazione sequenziale di un anticorpo specifico per l'antigene (Ab primario), un Ab secondario che lega l'anticorpo primario e di un complesso enzimatico con un substrato cromogeno. L'applicazione dei tre reagenti è intervallata da fasi di lavaggio. L'attivazione enzimatica del cromogeno produce una reazione visibile in corrispondenza del sito antigenico. Il campione biologico può quindi essere contro - colorato e montato. I risultati vengono interpretati mediante un microscopio ottico e sono utili nella diagnosi differenziale di processi fisiopatologici, che possono essere più o meno associati ad un particolare antigene.

Le strutture positive vengono evidenziate in colore marrone.

Per l'indagine immunostochimica si utilizzano vetrini carichi positivamente e vi si fanno aderire sezioni biotiche di 3 µ circa, si lasciano quindi asciugare a 37° overnight.

Per questa indagine viene utilizzato l'immunocoloratore automatico BOND MAX (Leica).

Anticorpo CD 10

Nel nostro studio è stato usato l'anticorpo monoclonale murino liquido di classe IgG, clone 56C6 (diluizione 1:80 smascheramento a pH 9 per 20' a 95°) necessario per l'identificazione in microscopia ottica delle molecole CD 10 in sezioni incluse in paraffina. Tale anticorpo riconosce il CD 10 umano (CALLA, NEP, encefalinasì, neprisillina).

La positività dell'anticorpo anti CD10 è a localizzazione di membrana, evidenziata da un precipitato di colore marrone prodotto dalla reazione enzimatica catalizzata dalla perossidasi in presenza perossido di idrogeno e Diaminobenzidina.

BCL -6

Nel nostro studio è stato usato l'anticorpo monoclonale murino liquido clone LN22 diluito 1:100, smascheramento pH 9 per 20' a 95°.

MUM 1

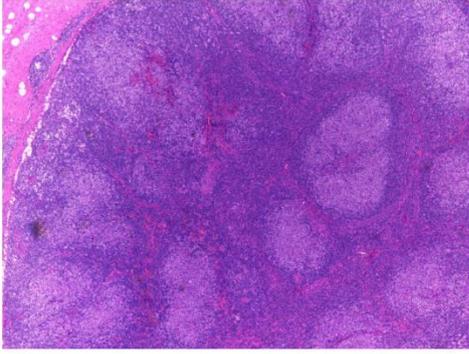
Nel nostro studio MUM 1 è un anticorpo monoclonale murino anti-umano delle ditte Leica della sottoclasse IgG1 clone EAU32 pronto all'uso, con smascheramento a pH 9 per 20' a 95°, per l'identificazione qualitativa al microscopio ottico dell'oncogene MUM 1, in tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina. La positività è nucleare ed è evidenziata dalla reazione data dall'enzima perossidasi che catalizza la reazione tra H₂O₂ e Diaminobenzidina dando un precipitato marrone sul sito di legame antigene - l'anticorpo.

4. Risultati e Analisi

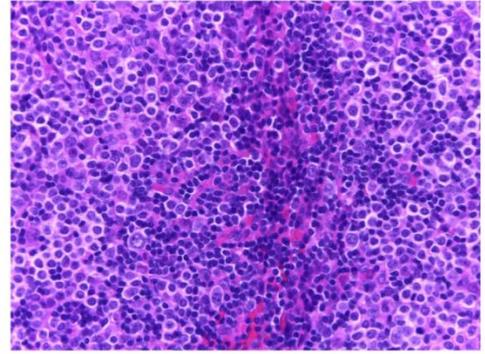
Dei 13 casi esaminati si hanno ottenuto i seguenti risultati:

CASI	CD10	Bcl 6	MUM 1	Istotipo
1	-	-	+	Non GCB
2	-	+	+	Non GCB
3	+	/	/	GCB
4	-	+	+	Non GCB
5	-	+	+	Non GCB
6	-	-	+	Non GCB
7	-	+	-	GCB
8	-	+	+	Non GCB
9	-	-	+	Non GCB
10	+	/	/	GCB
11	-	+	-	GCB
12	+	/	/	GCB
13	-	-	+	Non GCB

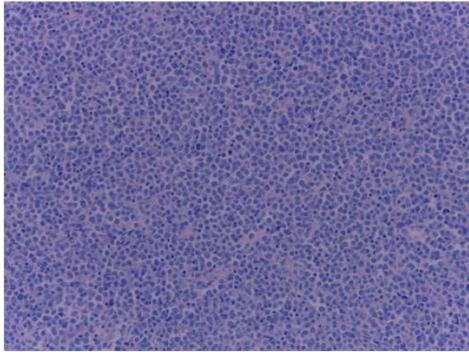
4 casi (1,6,9,13) sono risultati positivi per MUM1 e negativi per CD10 e Bcl-6 e vengono assegnati secondo l'algoritmo della fig. 7 al gruppo non-GCB DLBCL; allo stesso gruppo non-GCB vengono assegnati i 4 casi (2,4,5,8) che risultano positivi per Bcl-6 e MUM1 e negativi per CD10; 3 casi (3,10,12) vengono assegnati al gruppo GCB DLBCL per la loro positività al CD10; allo stesso gruppo GCB DLBCL vengono assegnati i due casi (7,11) risultati positivi alla Bcl-6 e negativi per CD10 e MUM1.



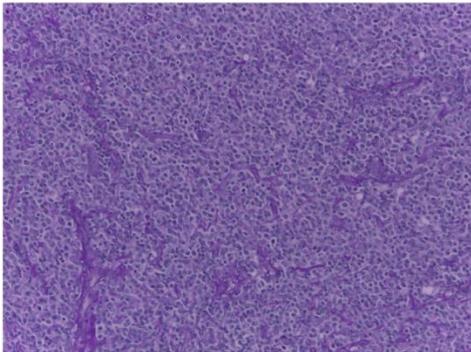
Ematossilina ed Eosina (5X)



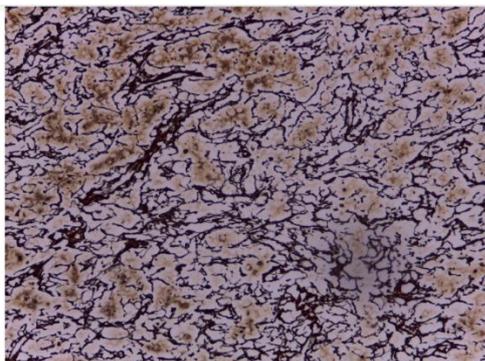
Ematossilina ed Eosina (20X)



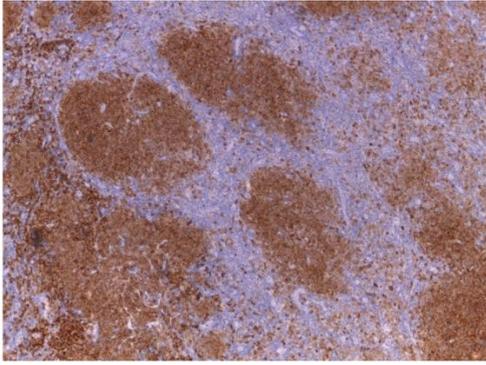
Giemsa (20x)



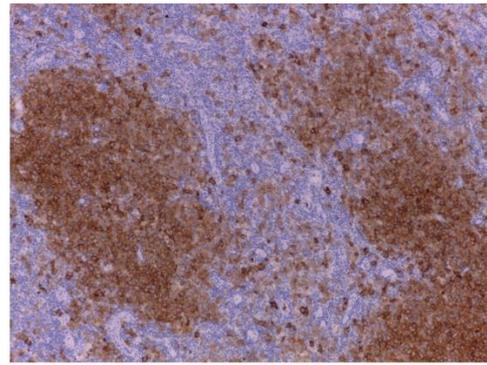
Reattivo di Schiff (PAS) (20x)



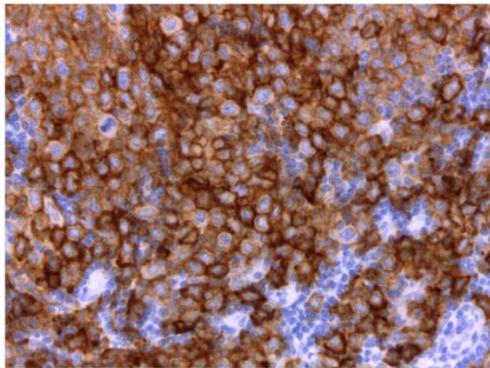
Gomori (20X)



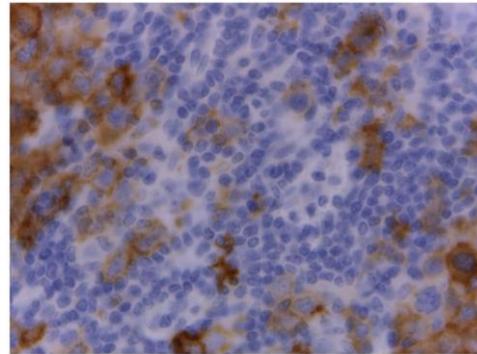
Anti-CD10 positivo (5x)



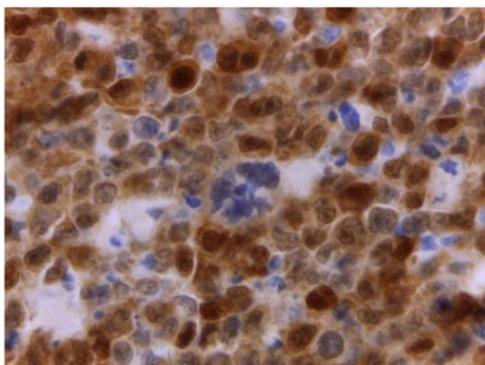
Anti-CD10 positivo (20x)



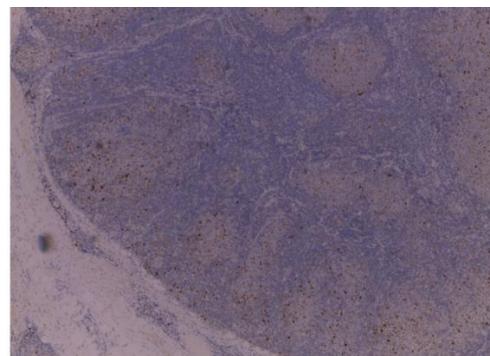
Anti-CD10 positivo (40x)



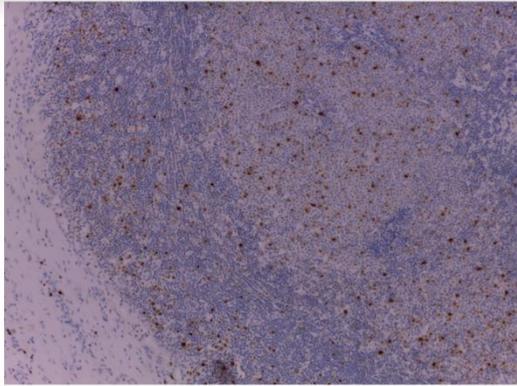
Anti-CD10 negativo (40x)



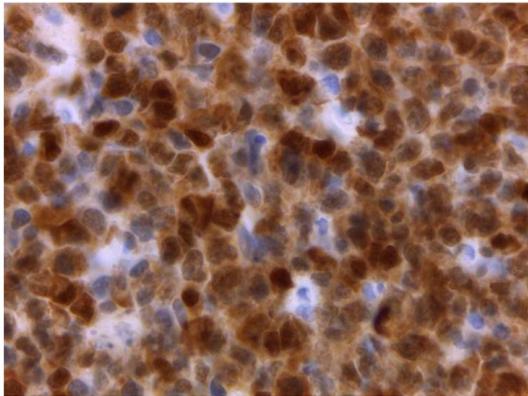
Anti BCL-6 positivo (60x)



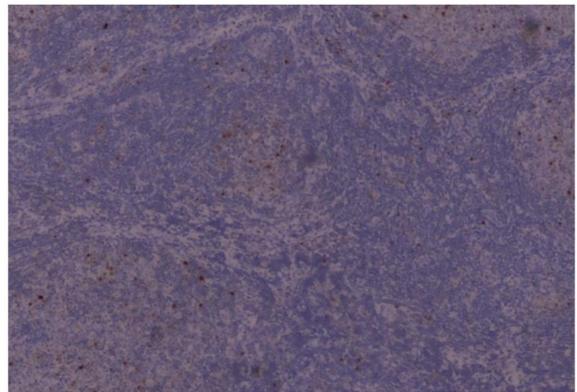
Anti BCL negativo (5X)



Anti BCL-6 negativo (X10)



Anti MUM 1 positivo (X60)



Anti MUM 1 negativo (5X)

5. Conclusioni

I risultati ottenuti hanno permesso di sottoclassificare i pazienti con Linfoma a Grandi cellule B Diffuse in 2 sottogruppi fenotipicamente differenti, a cui corrispondono 2 sottotipi molecolari prognosticamente diversi e cioè 5 pazienti sono stati assegnati al sottogruppo Linfoma a Grandi Cellule Diffuse GCB e 8 pazienti sono stati assegnati al sottogruppo Linfoma a Grandi Cellule Diffuse non-GCB. Quindi i pazienti del sottogruppo GCB DLBCL potrebbero, in caso di non remissione dopo terapia standard, avvalersi delle innovative terapie con anticorpi monoclonali anti CD20. Mentre i pazienti assegnati al sottogruppo non-GCB non possono beneficiare della terapia con anticorpi monoclonali poiché non originano dal centro germinativo, e saranno quindi sottoposti ai protocolli chemioterapici standard.

In commercio esistono tecniche di ultima generazione che permettono indagini molecolari più sofisticate e accurate, che necessitano di risorse economiche di notevole impegno, e perciò attuabili solo nei centri di riferimento specializzati.

La metodica di immunohistochimica, essendo tecnica di routine in ogni laboratorio di anatomia patologica, permette di ottenere risultati diagnostici dettagliati e quindi approcci terapeutici mirati.

Questa considerazione è doverosa se si entra in una visione più ampia e meramente economica in cui le aziende ospedaliere devono costantemente confrontarsi in quanto i problemi di bilancio economico richiedono un costante controllo da parte delle aziende che devono rispettare le direttive imposte dalla spending review.

6. Bibliografia

1. Bonadonna G. In: Bonadonna G, Robustelli della Cuna G, Valagussa P - Medicina Oncologica, Ottava Edizione. Elsevier Masson, Milano, 2007;
2. AIOM linee guida Linfomi. Edizione 2013;
3. AA Alizadeh, MB Eisen, RE Davis, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-511;
4. A Rosenwald, G Wright, WC Chan, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl JMed* 2002;346:1937-1947;
5. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Last KW, Norton A, Lister TA, Mesirov J, Neuberg DS, Lander ES, Aster JC, Golub TR. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2002;8: 68-74;
6. Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, Colomer D, Falini Brunangelo, Montserrat E, Campo E. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2003;101:78-84;
7. Witzig T, Gordon L, Cabanillas F, et al. Randomized controlled trial of yttrium 90-labeled ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy versus rituximab immunotherapy for patients with relapsed or refractory low-grade, follicular lymphoma, or transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 20:2453-2463, 2002;
8. Wiseman G, Gordon L, Multani P, et al. Ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy for patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma and mild thrombocytopenia- a phase II multicenter trial. *Blood* 99:4336-4342, 2002;
9. Witzig T, Flinn I, Gordon L, et al. Treatment with ibritumomab tiuxetan radioimmunotherapy in patients with rituximab-refractory follicular non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 20: 3262-3269, 2002;