

Nell' immunisto chimica si possono utilizzare due tipi di anticorpi

ANTISIERO o ANTICORPO POLICLONALE

Miscela eterogenea di molecole anticorpali di diversa sottoclasse, fine specificità, affinità e selettività perché rivolti contro più determinanti antigenici dell'antigene

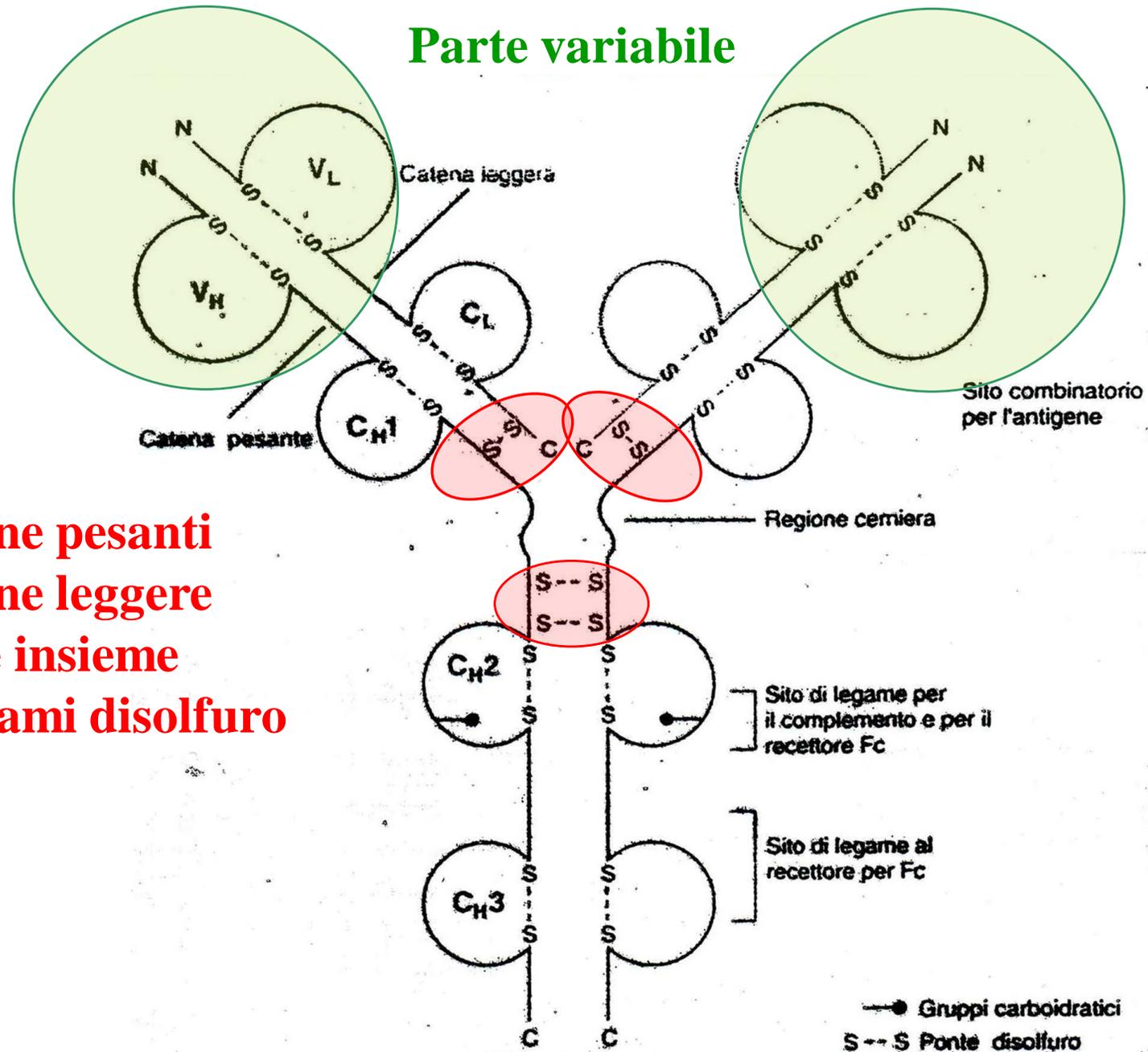
SIERO: fase fluida del sangue coagulato

ANTICORPO MONOCLONALE

E' il prodotto di un singolo clone di linfociti B

Ogni anticorpo ha le stesse caratteristiche fisico-chimiche quindi è un reagente omogeneo diretto contro un solo determinante antigenico

Parte variabile



2 catene pesanti
2 catene leggere
tenute insieme
da legami disolfuro

Vantaggi e svantaggi

Gli anticorpi policlonali hanno alta affinità ma bassa specificità per gli antigeni

Possono dare background e falsi positivi, costano meno dei monoclonali

Gli anticorpi monoclonali hanno bassa affinità ma alta specificità per gli antigeni

Possono dare colorazioni più deboli e sono costosi

BIOLOGIA MOLECOLARE

Ha fondamentalmente due scopi

DIMOSTRAZIONE DELLA CLONALITA': LINFOMI
LEUCEMIE LINFOIDI

DIMOSTRAZIONE DI
ALTERAZIONI
GENETICHE



SCOPO
DIAGNOSTICO
(e di ricerca)



soprattutto
SCOPO
TERAPEUTICO

CONCETTO DI CLONALITA'

Una neoplasia è derivata dalla proliferazione di un unico precursore comune per questo è definita clonale, pertanto, tutte le cellule tumorali contengono un'identica sequenza di DNA, che può essere utilizzata come marker specifico di neoplasia

Le tecniche di biologia molecolare sono in grado di rivelare la clonalità **anche se questa interessa l'1% delle cellule del campione** e sono indicate anche per **monitorare la malattia durante e dopo il trattamento antitumorale**.

dopo il trattamento si parla di **malattia residua minima**
Le tecniche di biologia molecolare sono in grado di rivelarla

DIMOSTRAZIONE DELLA CLONALITA'

- 1) Diagnosi differenziale tra iperplasia reattiva dei linfociti legata all'inflammazione e linfoma/leucemia linfoide soprattutto nelle neoplasie linfocitarie mature
- 2) Diagnosi differenziale tra neoplasie linfocitarie mature e altri tumori a piccole cellule come microcitoma, neuroblastoma ecc questo specialmente se abbiamo una metastasi senza sapere da dove viene

Cos'è un tumore a piccole cellule?

Cos'è una leucemia linfoide?

Che cos'è un linfoma ?

infiammazioni croniche sono policlonali

Autoimmuni (tiroiditi) e non autoimmuni (es. helicobacter pilory)

le leucemie e i linfomi sono monoclonali

Immunosoppressione + virus



LINFOMA

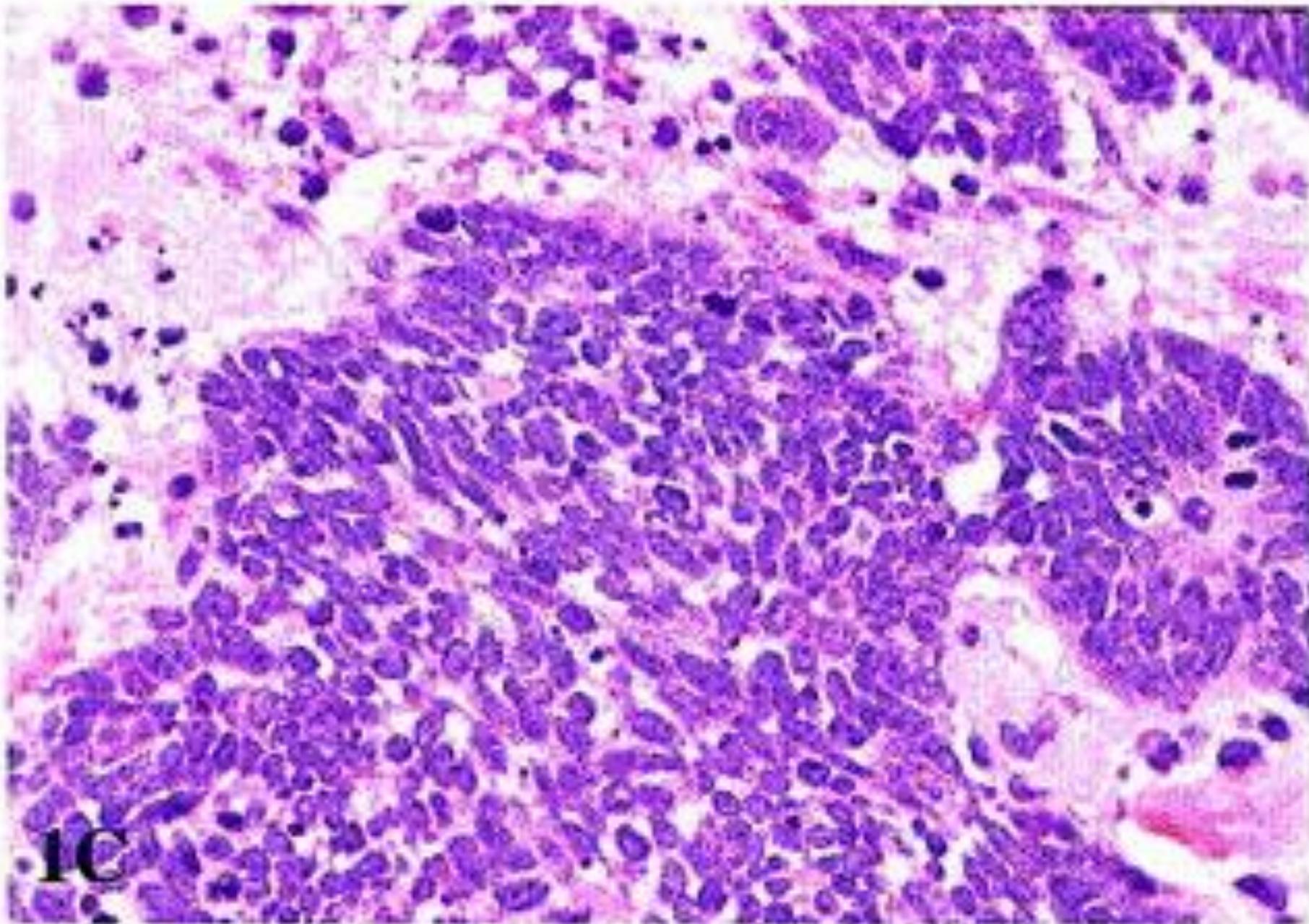
VIRUS EBV

PTLD postransplant proliferative disorders

1-5% dei trapianti d'organo

Non sempre è necessario usare tecniche di biologia molecolare soprattutto nel secondo caso (diagnosi differenziale tra le diverse neoplasie a piccole cellule) perché come prima cosa si esaminano i marcatori di membrana si usa immunofluorescenza e una macchina chiamata **citofluorimetro** che permette di quantizzare il numero delle cellule positive per un marker e l'intensità di fluorescenza

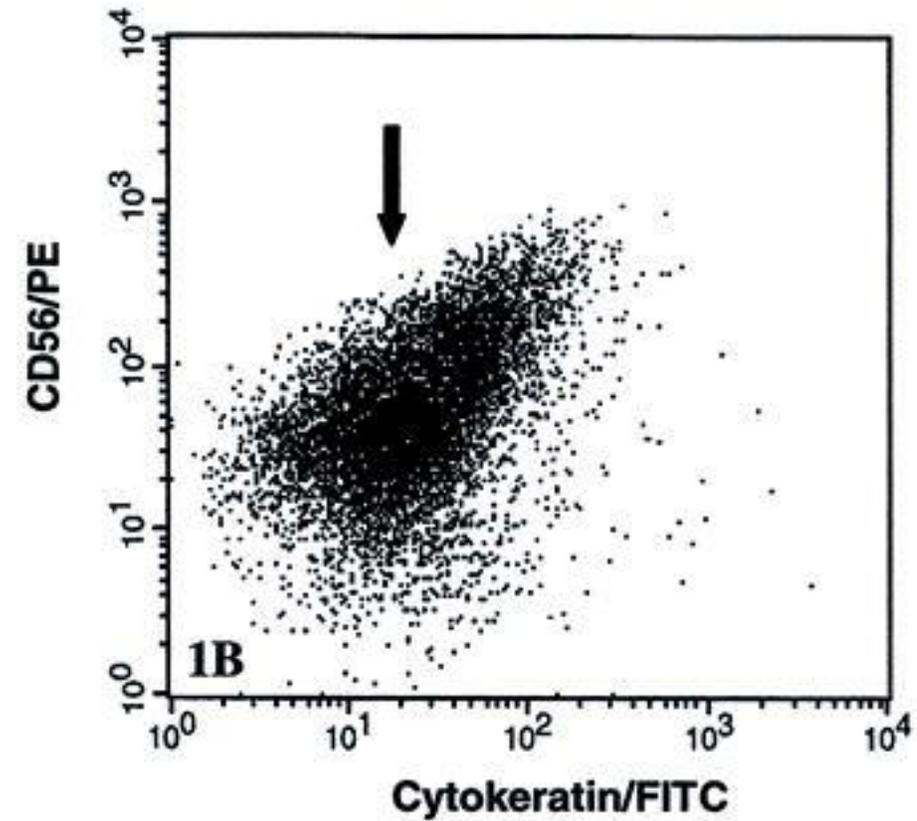
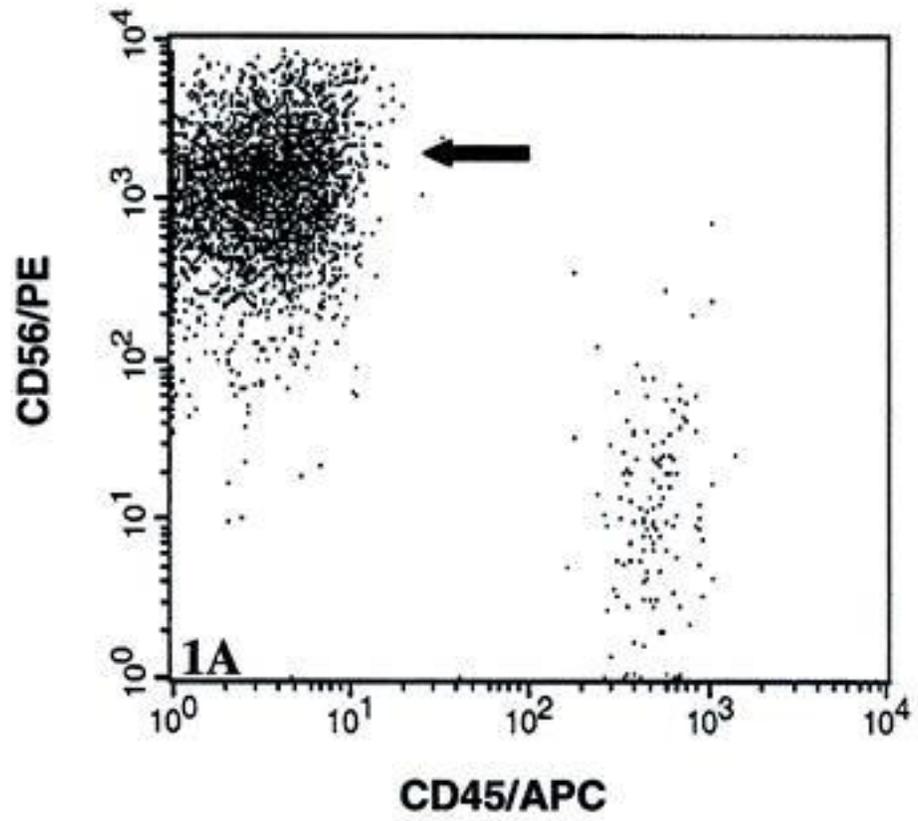
Esempio



Tumore a piccole cellule CHE COS'E' ?

E' un microcitoma o un linfoma ?

Doppia colorazione al citofluorimetro (immunofluorescenza):
CD45/CD56, CD56/citocheratine



Positivo al CD56 e alla citocheratina : **MICROCITOMA**
(negativo al CD45 che riconosce i leucociti, quindi non è un linfoma)

NEI LINFOMI E NELLE LEUCEMIE

SI ESAMINA UNA SEQUENZA SPECIFICA DEL DNA DEL RECETTORE PER L'ANTIGENE CHE SONO LE IMMUNOGLOBULINE DI MEMBRANA (B CELL RECEPTOR) PER LE NEOPLASIE DI TIPO B O DEL T CELL RECEPTOR PER LE NEOPLASIE DI TIPO T PER VEDERE SE SI PRESENTA IN MANIERA MONOCLONALE O POLICLONALE

1) si ottiene il DNA (estrazione)

2) si amplifica la sequenza desiderata mediante Polymerase Chain Reaction

Si esamina la sequenza per controllare che sia giusta

Il DNA si può ottenere da tessuto congelato o da cellule
(anche ago aspirato)

Il DNA si può ottenere da tessuto fissato in formalina o incluso in paraffina ma
è di qualità inferiore perché presenta rotture

Le sequenze che si desidera analizzare vengono amplificate in
reazioni di PCR
o POLYMERASE CHAIN REACTION

1) Estrazione del DNA

- Le sezioni raccolte in un tubo sterile sono state sparaffinate, reidratate e incubate per tutta la notte con proteinasi K a 37°C per digerire le proteine
- Inattivazione della proteinasi K a 95°C per 30'

2) Reazione di PCR

Preparare una miscela di amplificazione contenente: H₂O, nucleotidi (dNTP), sali necessari per il funzionamento della polimerasi (MgCl₂), Taq-polimerase e i primer che servono per posizionare la polimerasi nel punto che si desidera ricopiare

In questa miscela si metterà il DNA da esaminare e quindi inseriscono i campioni nel termociclatore.

Nota bene:

I primers sono specifici per il gene che si vuole analizzare
la sequenza da ricopiare non può essere troppo lunga
o la polimerasi non riuscirà a ricopiare

I primers non sono mai posizionati troppo lontano l'uno dall'altro

I primers ovviamente sono antiparalleli uno va da 5' a 3' e l'altro
da 3' a 5' (vedi l'esempio nella figura alla diapositiva 23)



Termociclatore computerizzato
opportunamente programmato

La PCR avviene attraverso una
serie di cicli
composti da tre fasi:

Denaturazione

Annealing

Allungamento

PCR

Denaturazione: si separano i due filamenti del DNA mediante alta temperatura

Annealing: il termociclatore quindi abbassa la temperatura così i due primer si posizioneranno in maniera antiparallela sui due filamenti separati

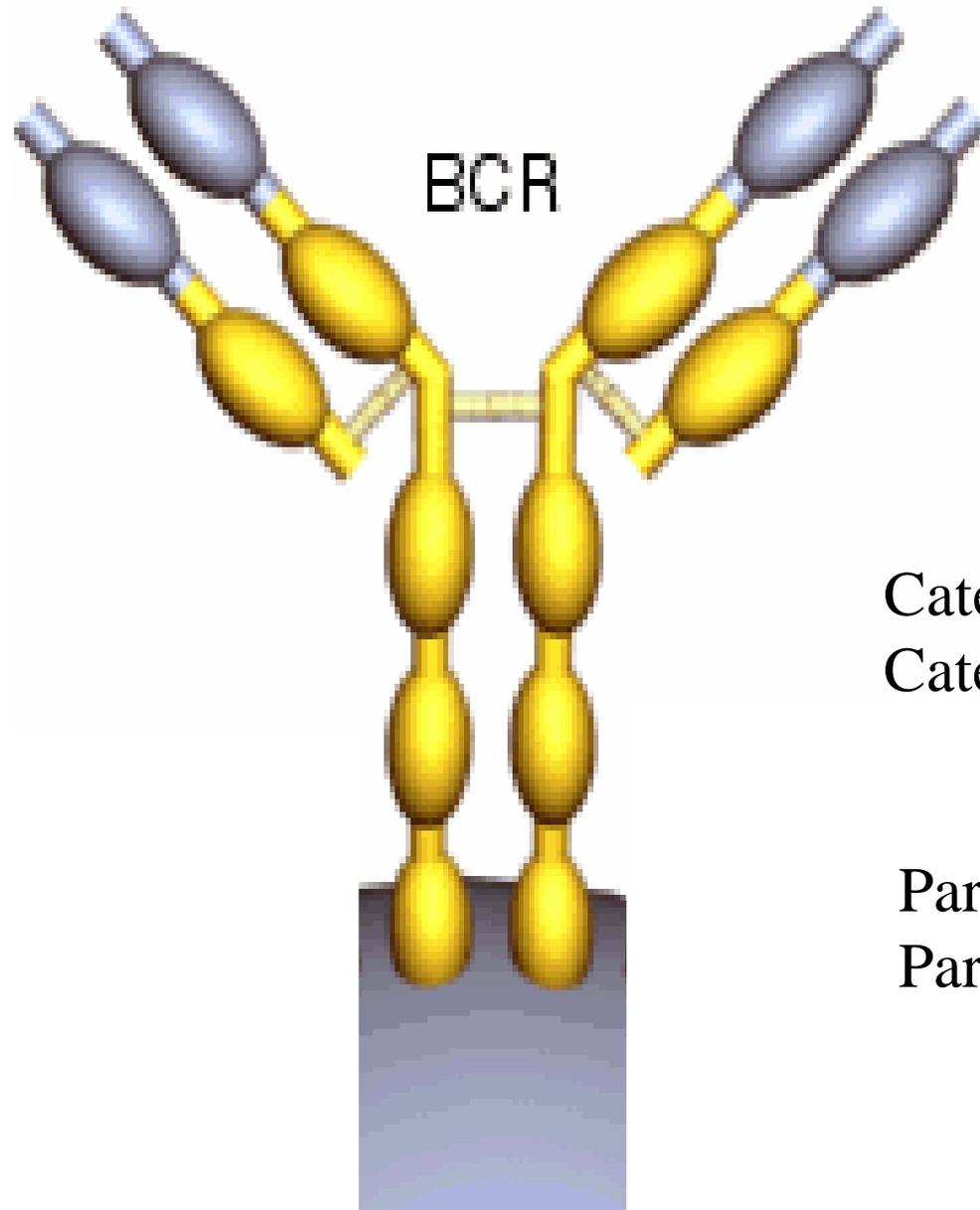
Allungamento: all'opportuna temperatura la DNA polimerasi userà i nucleotidi per ricopiare filamento di DNA complementare. Questa temperatura è specifica per ogni reazione e viene calcolata

Il termociclatore cambia le temperature ciclicamente e il prodotto di reazione così si accumula

La reazione PCR offre la possibilità di amplificare un prodotto derivato **dai riarrangiamenti genici clonali delle IMMUNOGLOBULINE**,
che sono i recettori dei linfociti B, o BCR
e del T CELL RECEPTOR, o TCR avvalendosi di primer specifici,
e di esaminare se è avvenuto il riarrangiamento correndo i prodotti della reazione di PCR su un gel di agarosio.

(Se si vuole inoltre si può utilizzare tale prodotto per il sequenziamento genetico cioè l'analisi della sequenza delle singole basi azotate)

CHE COS'E' UN RIARRANGIAMENTO ?



BCR

Catena pesante
Catena leggera

Parte costante
Parte variabile

Nel locus H o della catena pesante il processo di ricombinazione somatica che genera la regione variabile si realizzano in due eventi separati:

1) Nel linfocita pro-B precoce si ha la prima ricombinazione che porta al congiungimento di uno dei segmenti DH con uno dei segmenti JH, con la contemporanea delezione del tratto di DNA interposto (riarrangiamento DJ).

2) Nel linfocita pro-B tardivo, uno dei numerosi segmenti genici V si congiunge al complesso DJ precedentemente formato per dare origine all'esone completo della regione variabile della catena pesante (riarrangiamento VDJ).

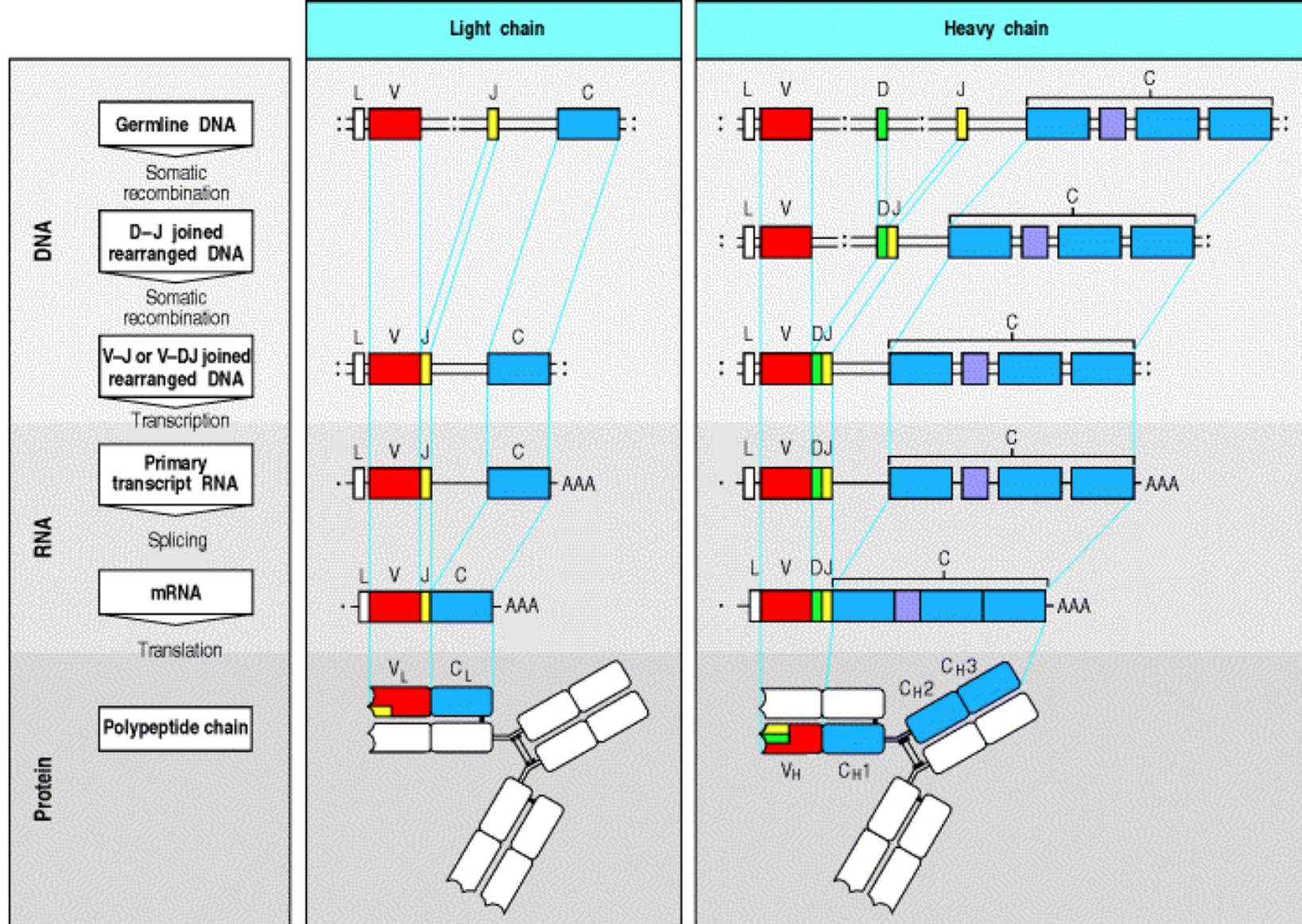
3) Durante lo splicing del trascritto primario di RNA, in seguito alla eliminazione degli introni, gli esoni della regione C si uniscono al complesso VDJ questo mRNA sarà tradotto con produzione della catena polipeptidica della catena pesante.

CONCETTO DI ESONE E INTRONE

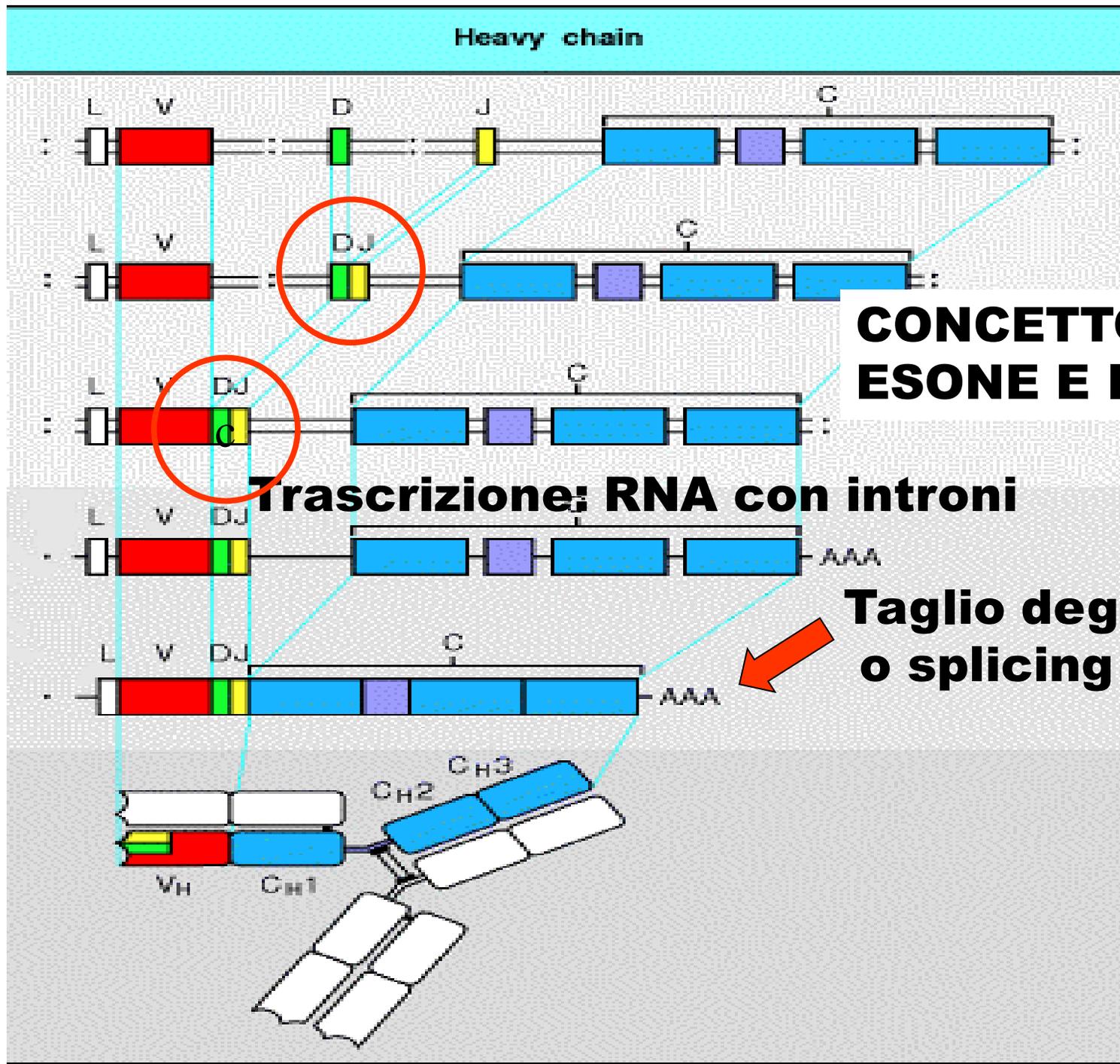
All'interno di un gene gli esoni sono quelle sequenze di DNA che codificano per le proteine gli introni sono sequenze regolatorie

Il trascritto primario di RNA contiene sequenze introniche ma queste vengono eliminate mediante un processo detto di "splicing"

La proteina viene tradotta dall'RNA che ha subito lo splicing e contiene perciò sequenze di aminoacidi corrispondenti alle sequenze di DNA degli esoni



Il DNA delle catene leggere e di quelle pesanti va incontro a riarrangiamento



Heavy chain

DNA

**CONCETTO DI
ESONE E INTRONE**

Trascrizione: RNA con introni

**Taglio degli introni
o splicing**

V_H

C_{H1}

C_{H2}

C_{H3}

L₁

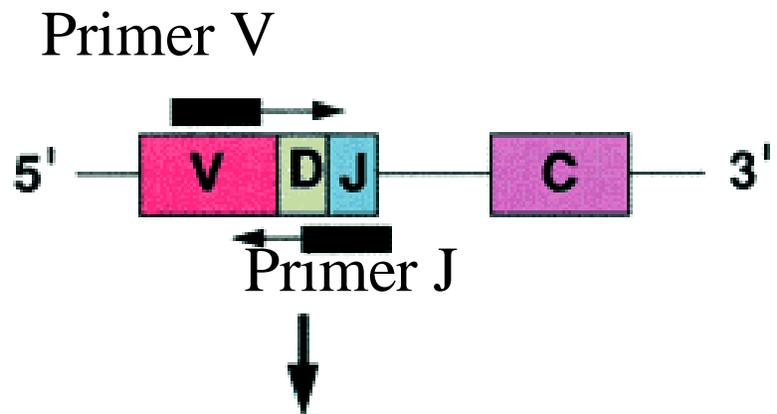
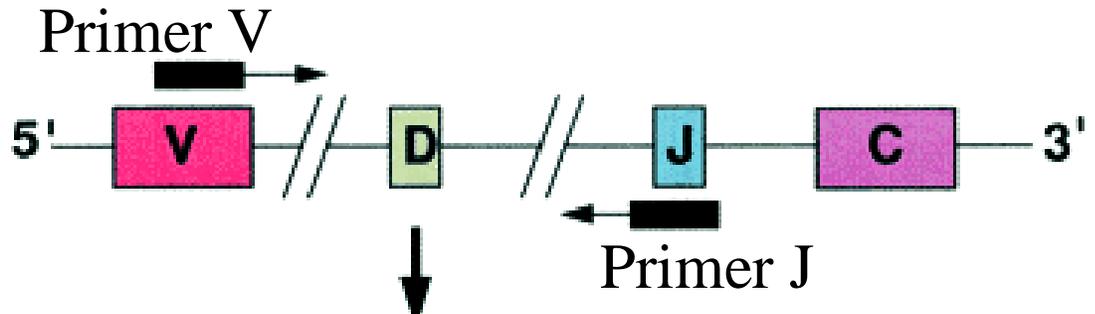
L₂

L₃

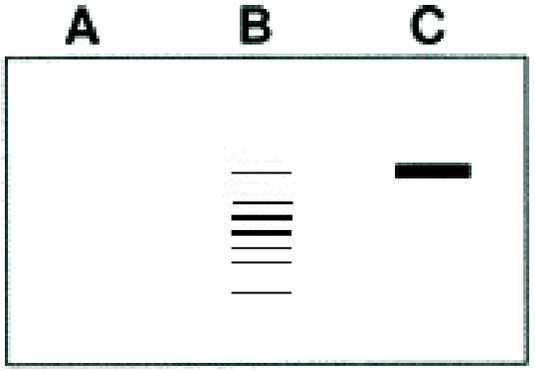
In una neoplasia linfoide ogni clone di cellule neoplastiche B o T presenta **un unico ed identico riarrangiamento genico** delle Ig o del TCR, che può essere utilizzato come marker molecolare specifico di clonalità

Vengono amplificate le V(D)J splice junctions nel DNA genomico estratto dal campione

mediante primer che legano il segmento genico V ed il segmento genico J della regione variabile delle catene pesanti delle Ig.



nessun prodotto di amplificazione



- A: prima del riarrangiamento o linea germinale
- B: popolazione policlonale
- C: popolazione monoclonale

prodotti di PCR su gel di agarosio

BIOLOGIA MOLECOLARE

DIMOSTRAZIONE DI ALTERAZIONI GENETICHE

mutazioni, inversioni, delezioni, amplificazioni, traslocazioni

COSA SONO ?

SCOPO
DIAGNOSTICO

SCOPO
TERAPEUTICO

Tumore di Ewing
Metastasi di altamente indifferenziati

SCOPO TERAPEUTICO

*Alcune alterazioni genetiche specifiche indicano
la sensibilità o la resistenza a farmaci specifici*

PCR seguita da sequenziamento per le mutazioni

FISH per amplificazioni, polisomie aneuploidie e traslocazioni

PCR e sequenziamento

Per le mutazioni si cercano gli “hot spot” cioè siti in cui avvengono più frequentemente determinate alterazioni (anche inserzioni o delezioni) quindi si analizzano esoni nel DNA ben precisi

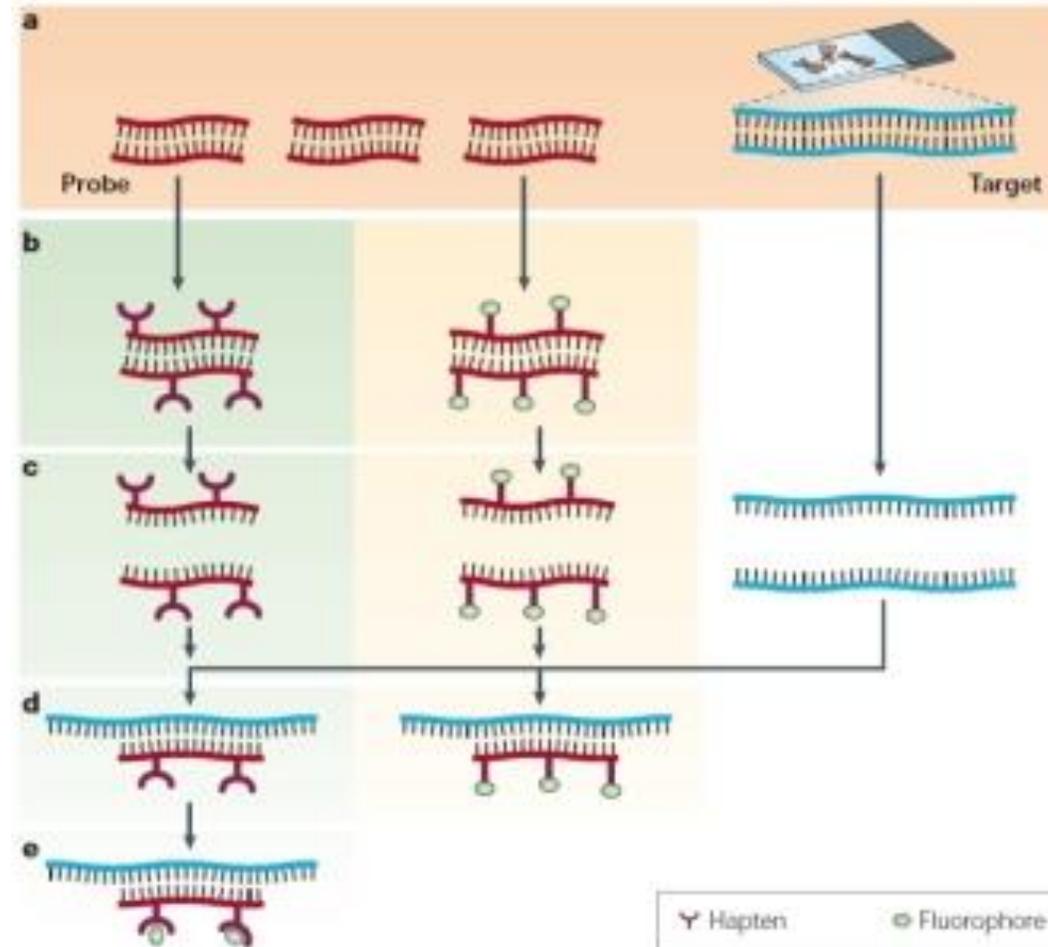
Per translocazioni, trisomie e amplificazioni invece è preferibile usare un altro tipo di tecnica la fluorescence in situ hybridization o FISH

Si utilizza una sonda specifica costituita da DNA marcato con un fluorocromo

La FISH è specialmente indicata nelle translocazioni perché considera l'integrità del gene più importante. Nelle translocazioni infatti un gene può avere diversi possibili partners sui quali translocare quindi con la FISH si studia se il gene importante è integro senza doverlo sequenziare e immaginarsi i possibili partners.

FISH : Fluorescence in situ hybridization

tecnica citogenetica usata per localizzare la presenza o l'assenza di specifiche sequenze di DNA sui cromosomi



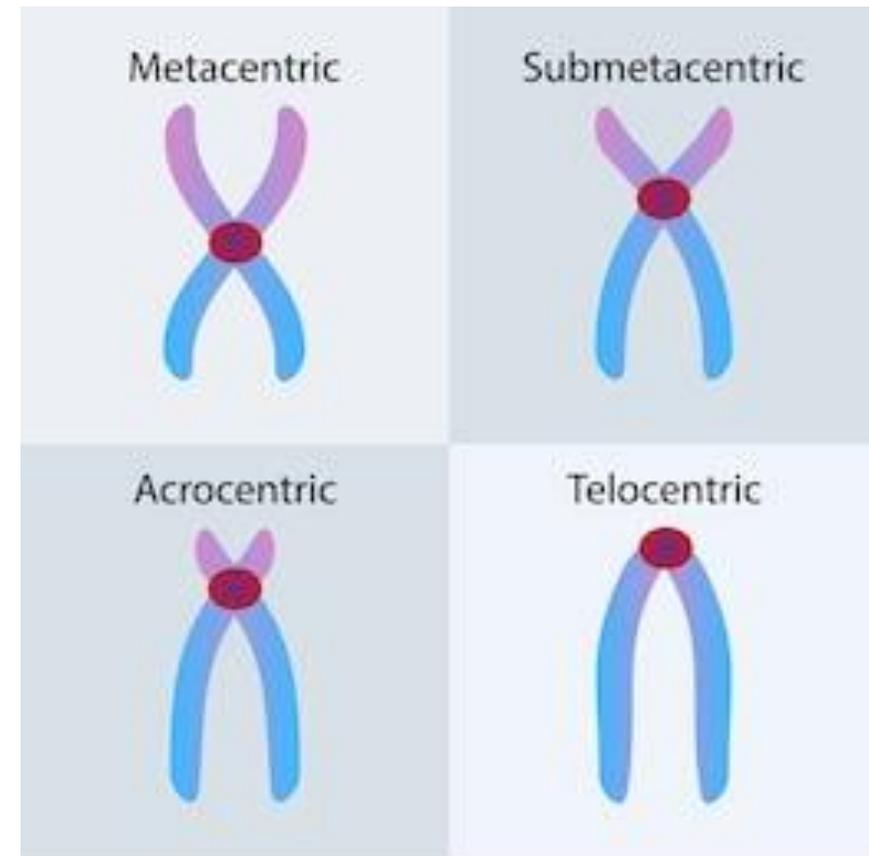
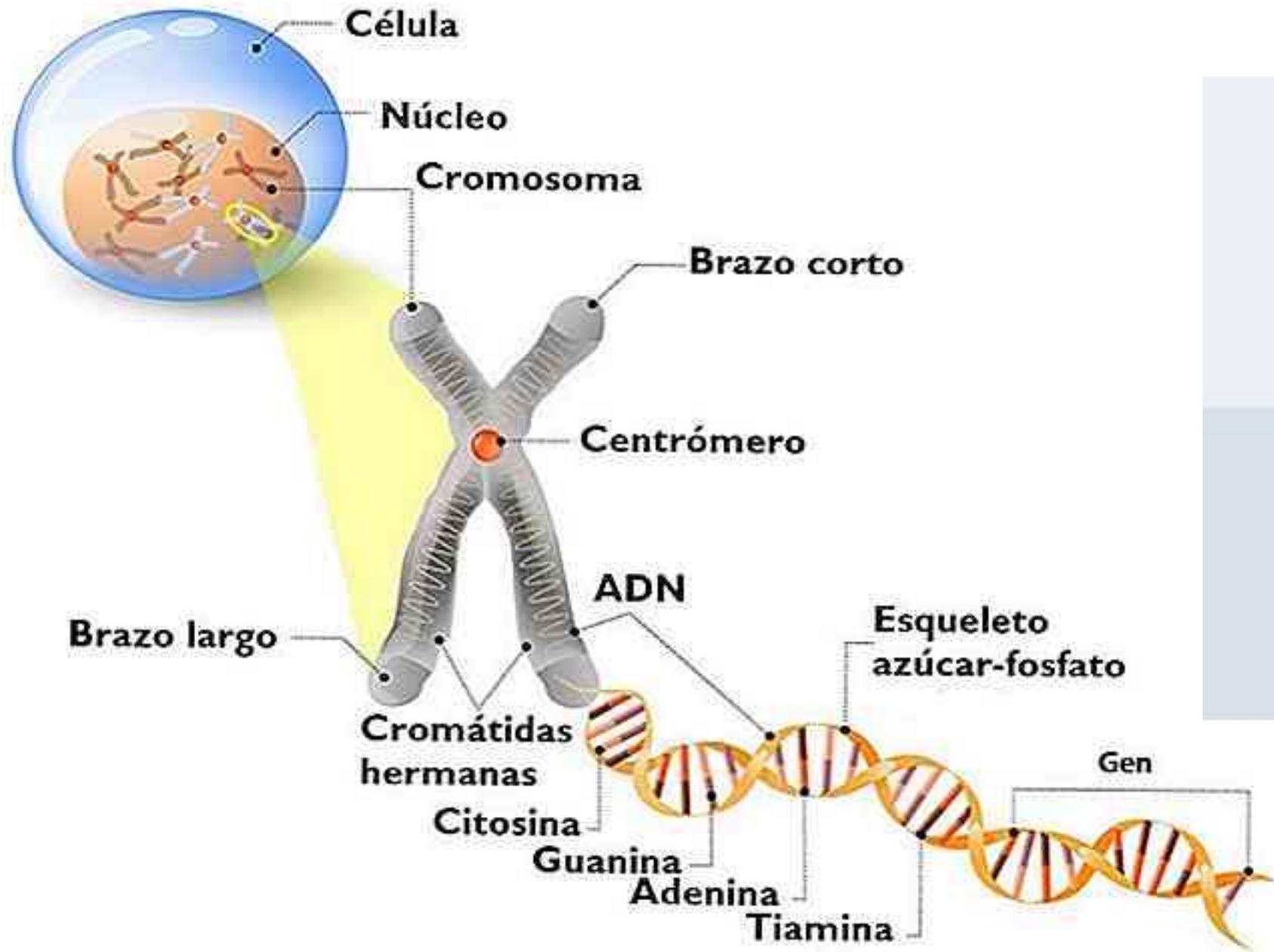
Metodo di base

PROTEASI rimozione delle proteine nucleari

DENATURAZIONE per produrre un DNA a singolo filamento

IBRIDIZZAZIONE interazione della sonda con il DNA target

CONTROCOLORAZIONE per localizzare i nuclei



Special locus-specific probe mixtures are often used to count chromosomes, by binding to the centromeric regions which are distinctive enough to identify each chromosome (with the exception of Chromosome 13, 14, 21, 22.)

APPLICAZIONI: trisomie

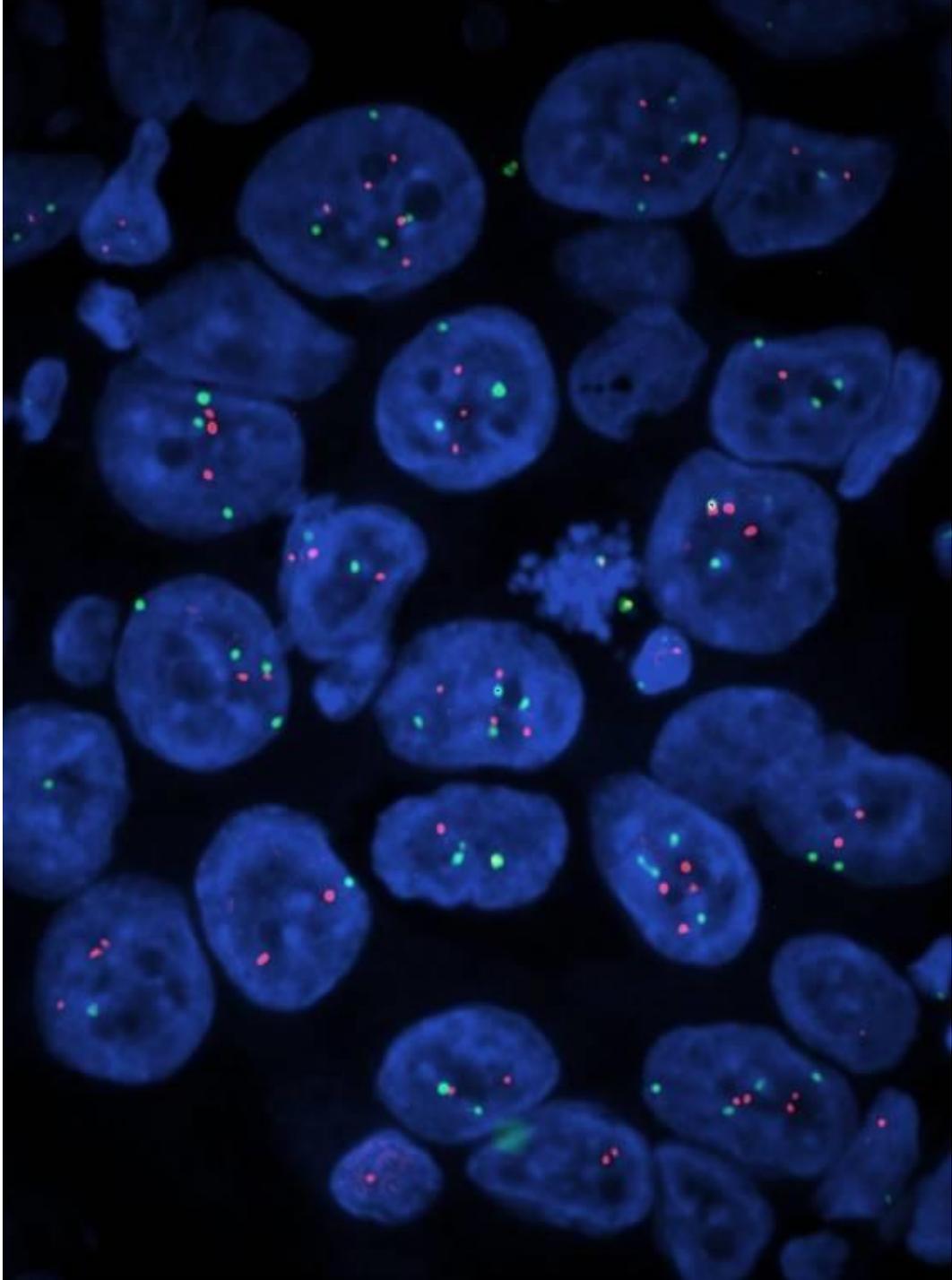
TRISOMIE

si usano due sonde, una rossa specifica per il centromero

e una verde per una sequenza **specifica** del cromosoma da testare

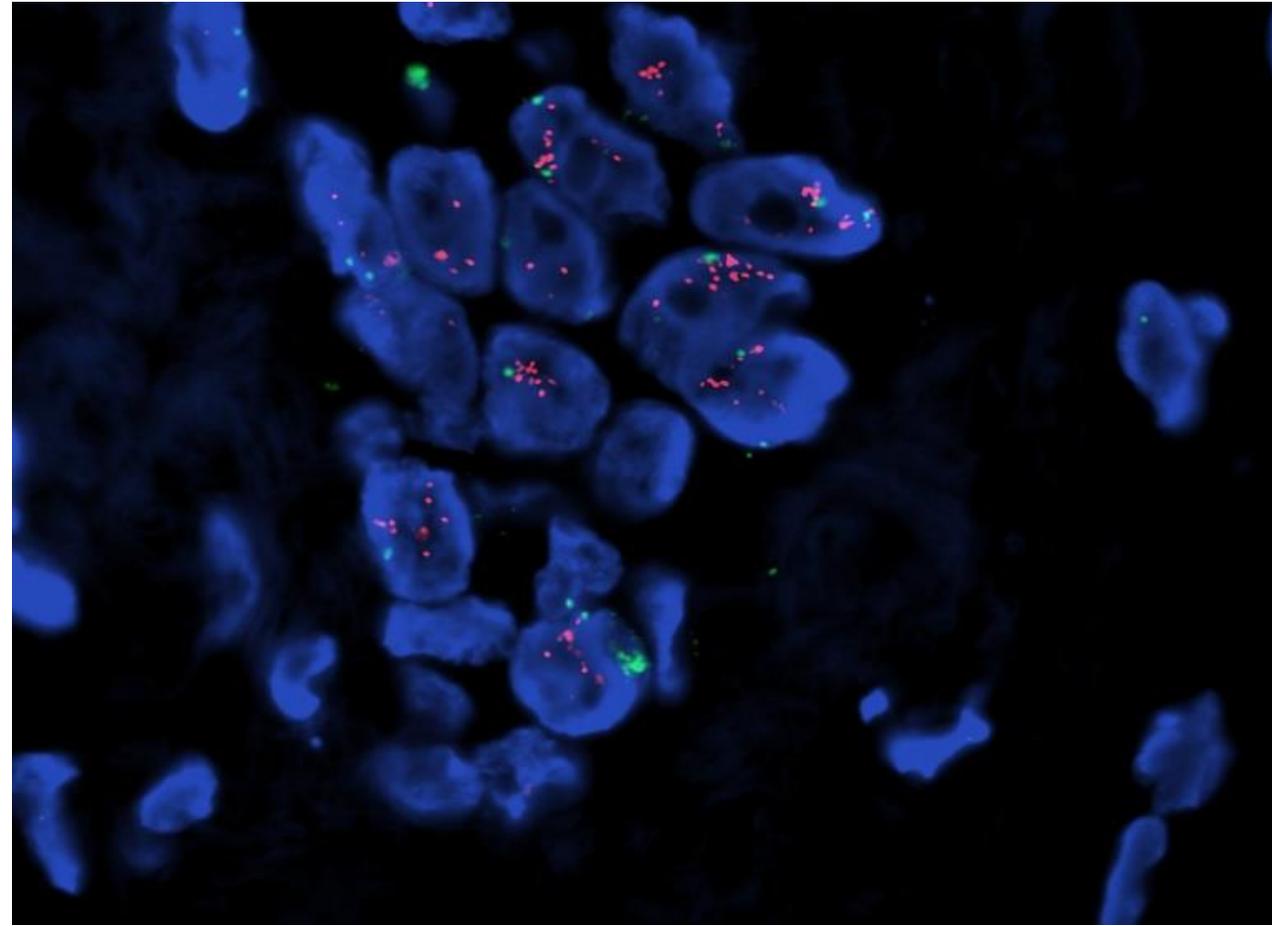
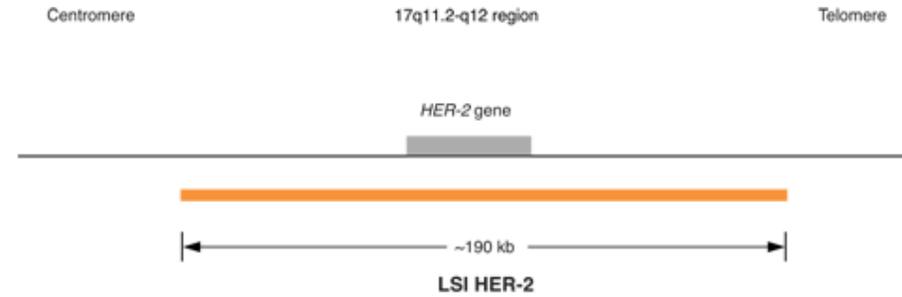
Cellula normale: si vedono due puntini fluorescenti rossi e due verdi

Cellula trisomica: tre rossi e tre verdi



AMPLIFICAZIONI

HER2 nel cancro
della mammella



TRASLOCAZIONI

FISH break-apart

Si usano due sonde, una verde e una rossa per regioni adiacenti dello stesso gene che sono noti per essere i punti di rottura.

Se la cellula non ha translocazione si vedranno

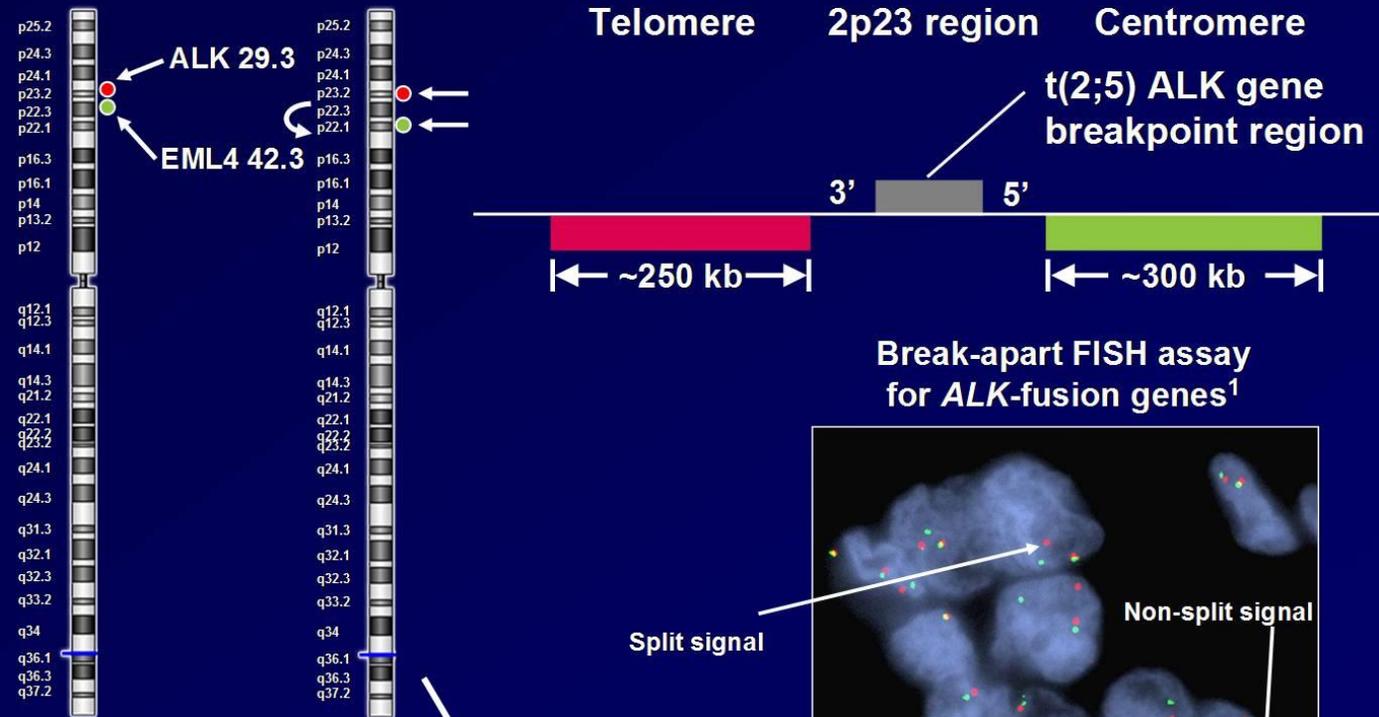
o due volte (2 cromosomi) due punti uno rosso e uno verde vicini

Oppure se il rosso e il verde si sovrappongono perché vicinissimi si vedranno due punti gialli

Se il gene è interrotto perché vi è una translocazione i punti verdi e quelli rossi saranno lontani.

TRANSLOCAZIONI - *EML4/ALK* nei tumori del polmone
 FISH “break-apart”

FISH Assay for *ALK* Rearrangement*



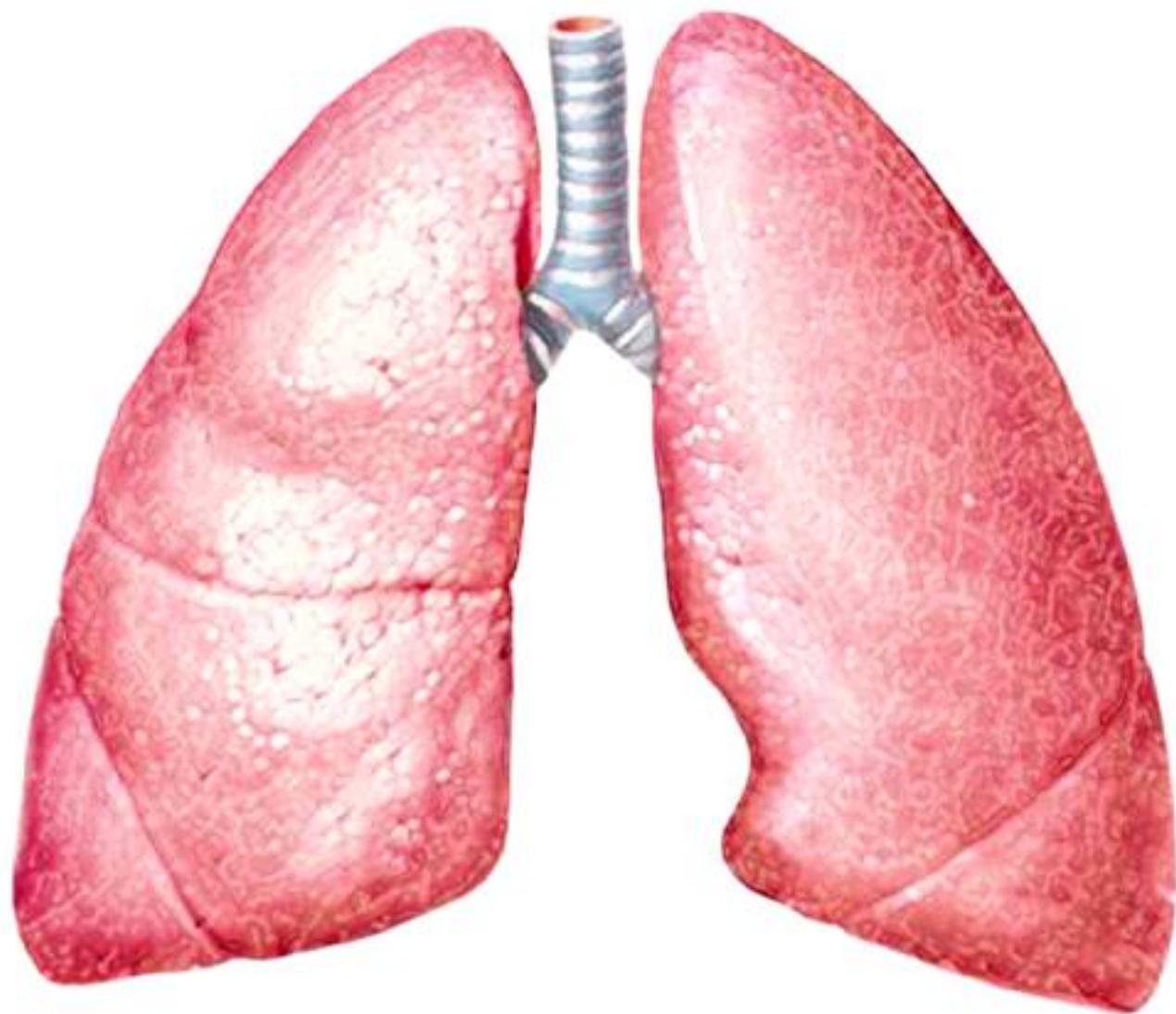
ALK break-apart FISH assay
 [Courtesy John Iafrate, Massachusetts General Hospital]

*Assay is positive if rearrangements can be detected in $\geq 15\%$ of cells
 FISH = fluorescence in situ hybridization

¹Shaw AT et al. J Clin Oncol
 2009;27:4247-4253

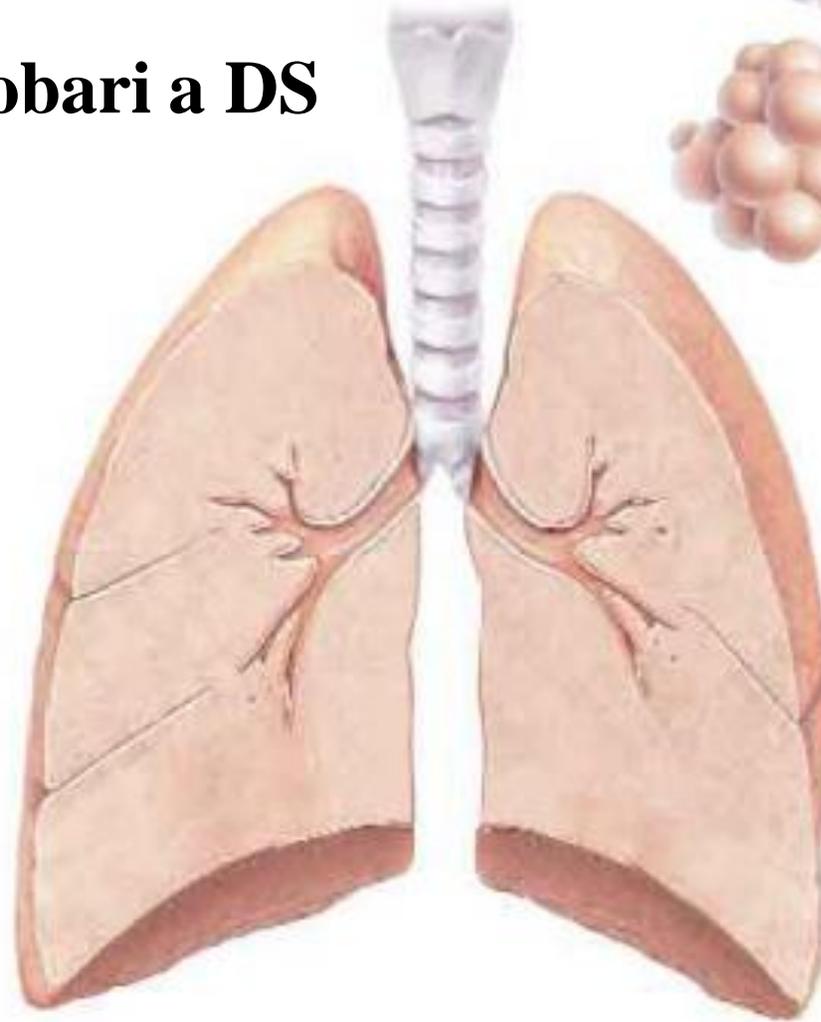
TUMORI DEL POLMONE E NEUROENDOCRINI

Normal lungs



Normal lungs and alveoli

3 bronchi lobari a DS



**2 bronchi lobari
a sn**

POLMONI

Bronchi bronchi **PRINCIPALI**
vari tipi di **SECONDARI** : (**3 lobari a ds, 2 lobari a sn segmentali, subsegmentali ecc.**) come la trachea i bronchi principali sono dotati di anelli cartilaginei.

Bronchioli i bronchioli non hanno cartilagine e ghiandole mucose e si riducono progressivamente di diametro

Bronchioli terminali

Bronchioli respiratori

Dotti e sacchi alveolari

BRONCHI

Gli **anelli cartilaginei** quando il bronco principale entra nel parenchima divengono **placche**

Mucosa

Tonaca propria

Strato delle cellule muscolari lisce

Connettivo compatto

Ovunque sono presenti fibre elastiche

Ghiandole mucose che si approfondano nello strato muscolare

MUCOSA:

Epitelio cilindrico ciliato

Cellule caliciformi mucipare

Cellule neuroendocrine

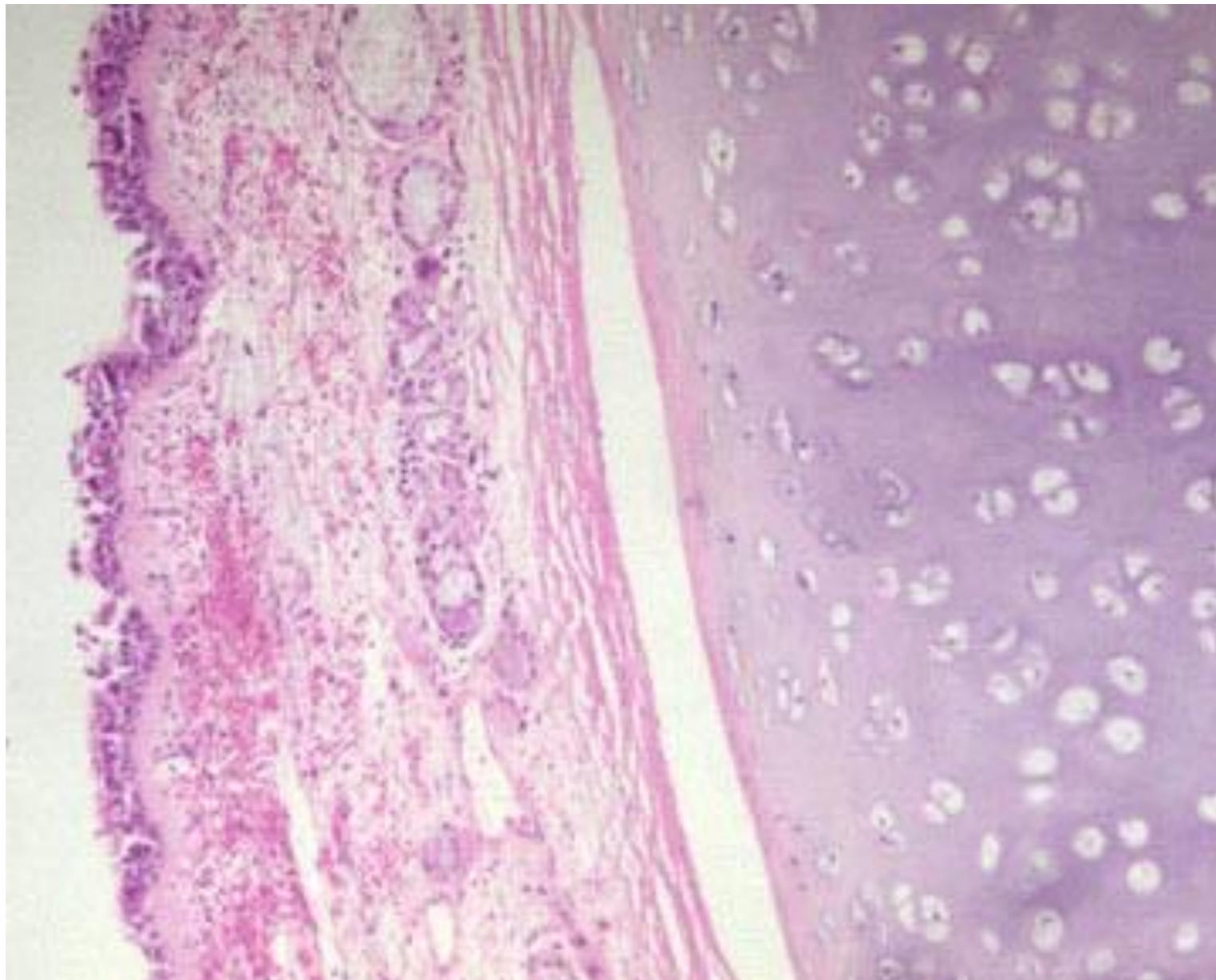
1

2

3

4

5



BRONCHIOLI

Assenza di cartilagine e ghiandole sottomucose

Epitelio ciliato

Cellule caliciformi mucipare

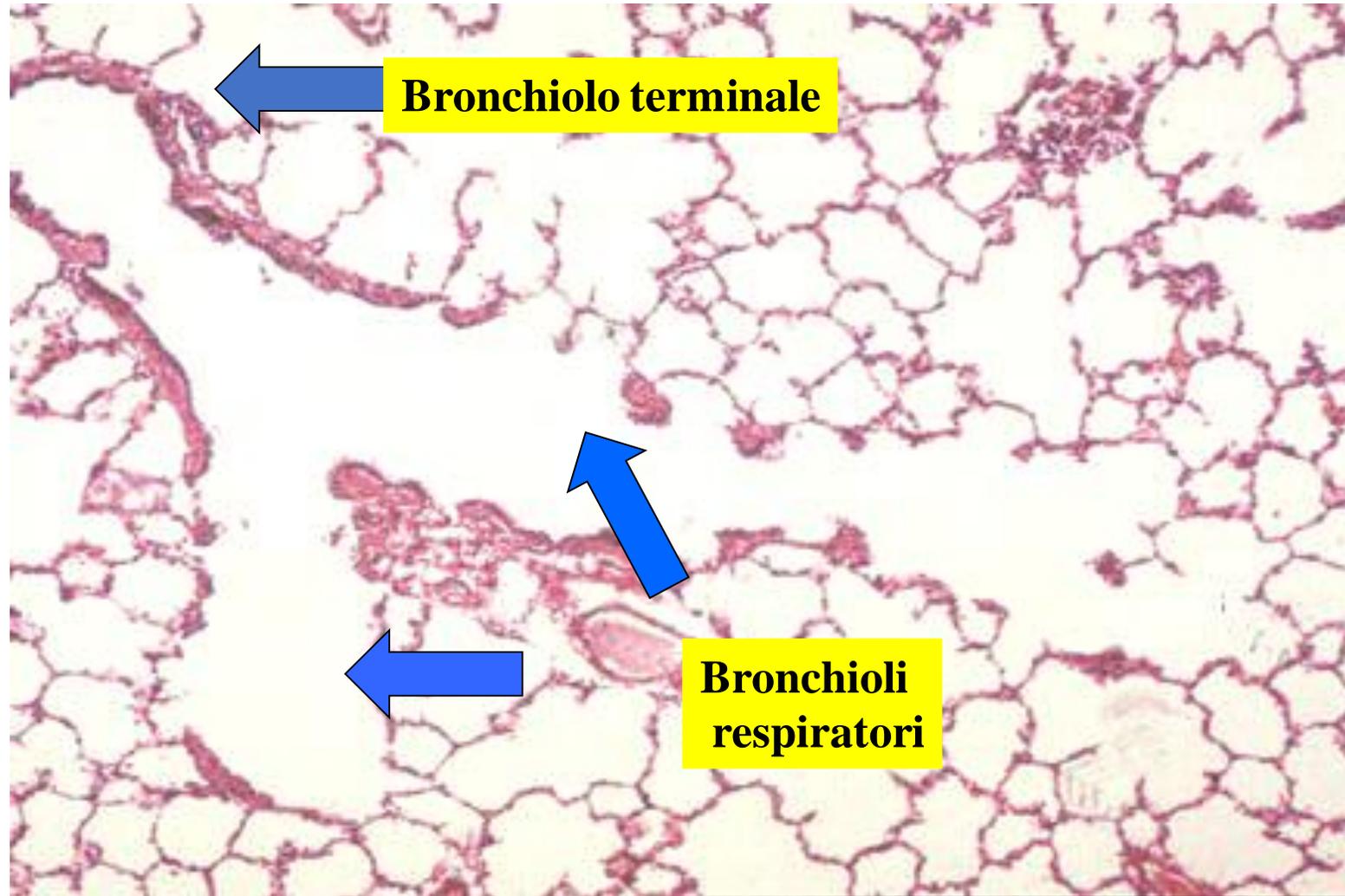
Cellule neuroendocrine

Cellule di Clara

CELLULE DI CLARA

hanno funzioni secretorie (granuli PAS positivi diastasi-resistenti) sono quelle che riparano l'epitelio in caso di danno

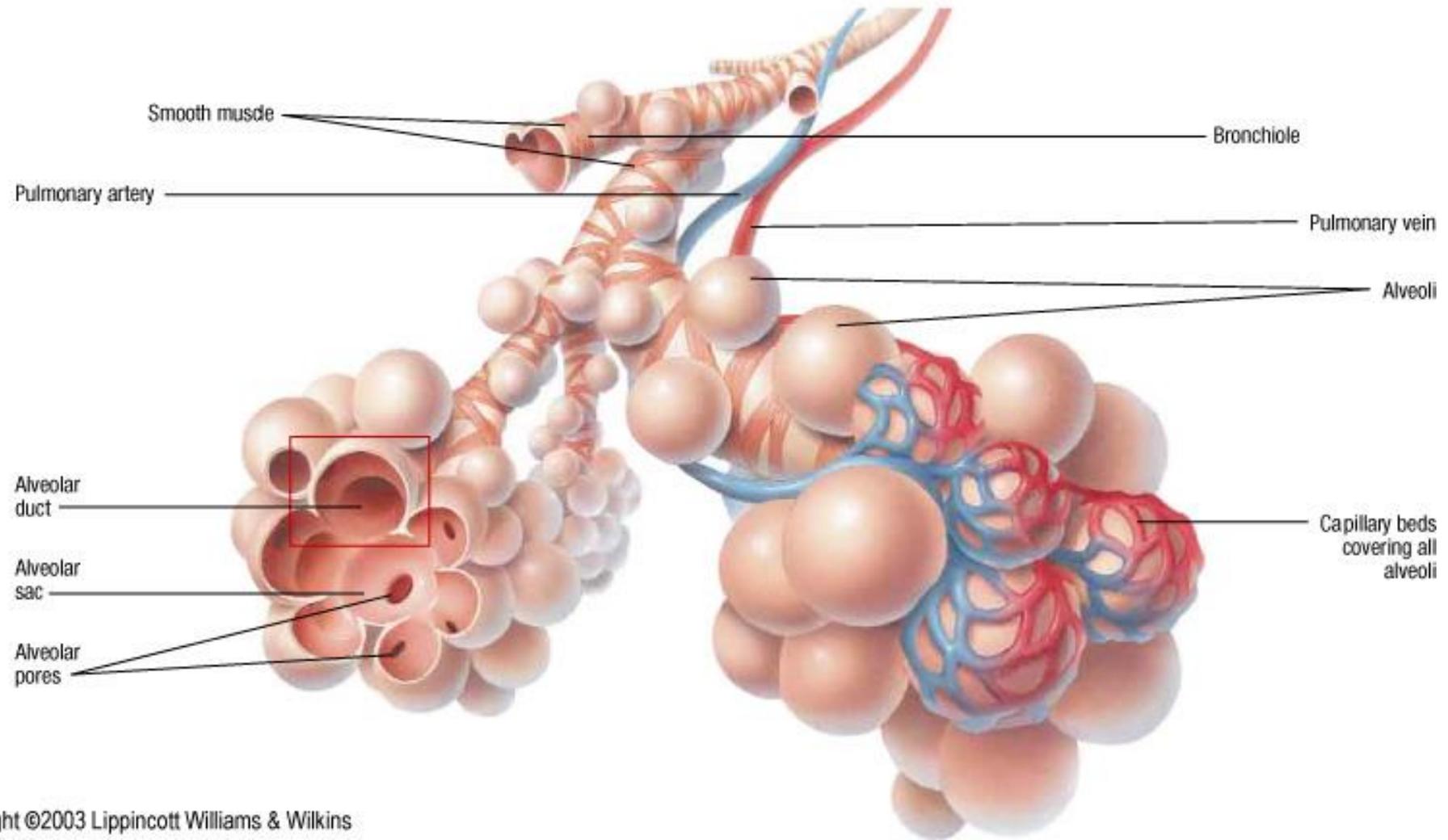
Possono dare origine agli adenocarcinomi



Bronchiolo terminale

**Bronchioli
respiratori**

NORMAL ALVEOLI



PARETE ALVEOLARE

Dal sangue verso l'aria

Cellula endoteliale

Membrana basale

Tessuto interstiziale contenente fibroblasti fibre elastiche e collagene

Epitelio alveolare: Pneumociti **tipo I** appiattiti sono la maggioranza
Pneumociti **tipo II** rotondi producono surfactante

In caso di danno i pneumociti di tipo II proliferano per rimpiazzare le cellule danneggiate

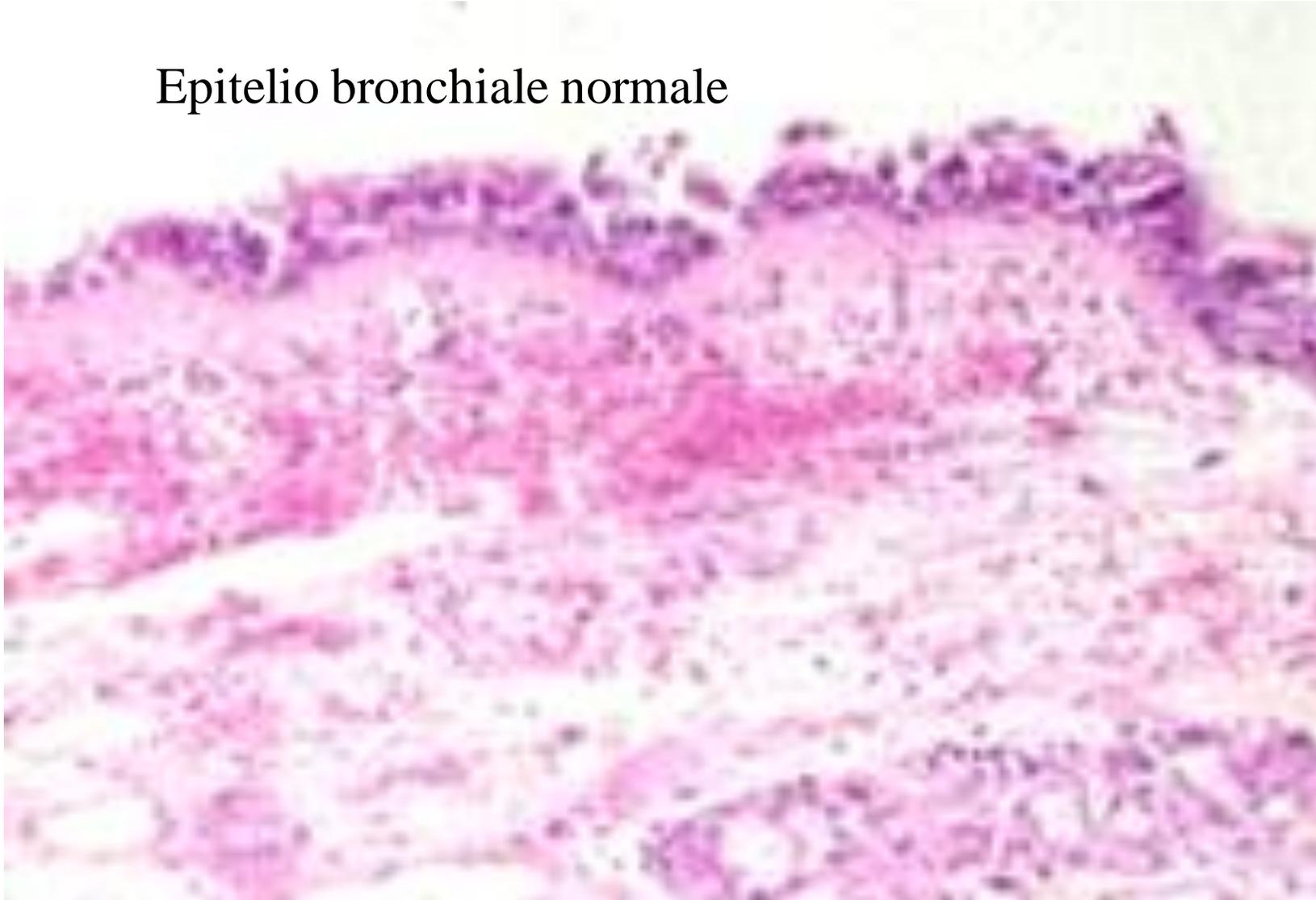
Nell'alveolo fluttuano i macrofagi alveolari

Anche dai pneumociti possono originare tumori

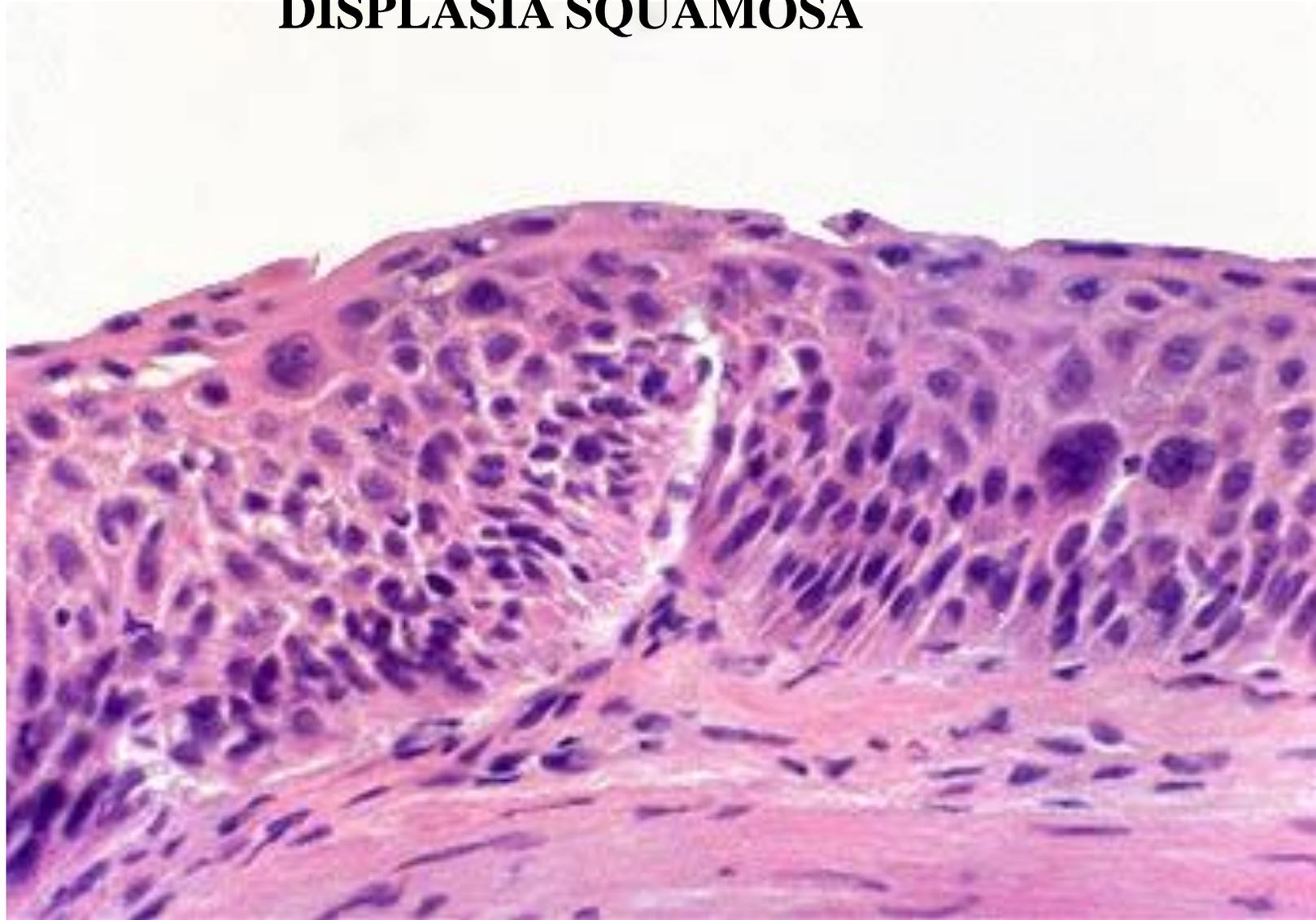
LESIONI PRE-NEOPLASTICHE dell'EPITELIO BRONCHIALE CILINDRICO CILIATO

Displasia squamosa: focus di cellule epiteliali squamose, cheratinizzanti, con atipie citologiche

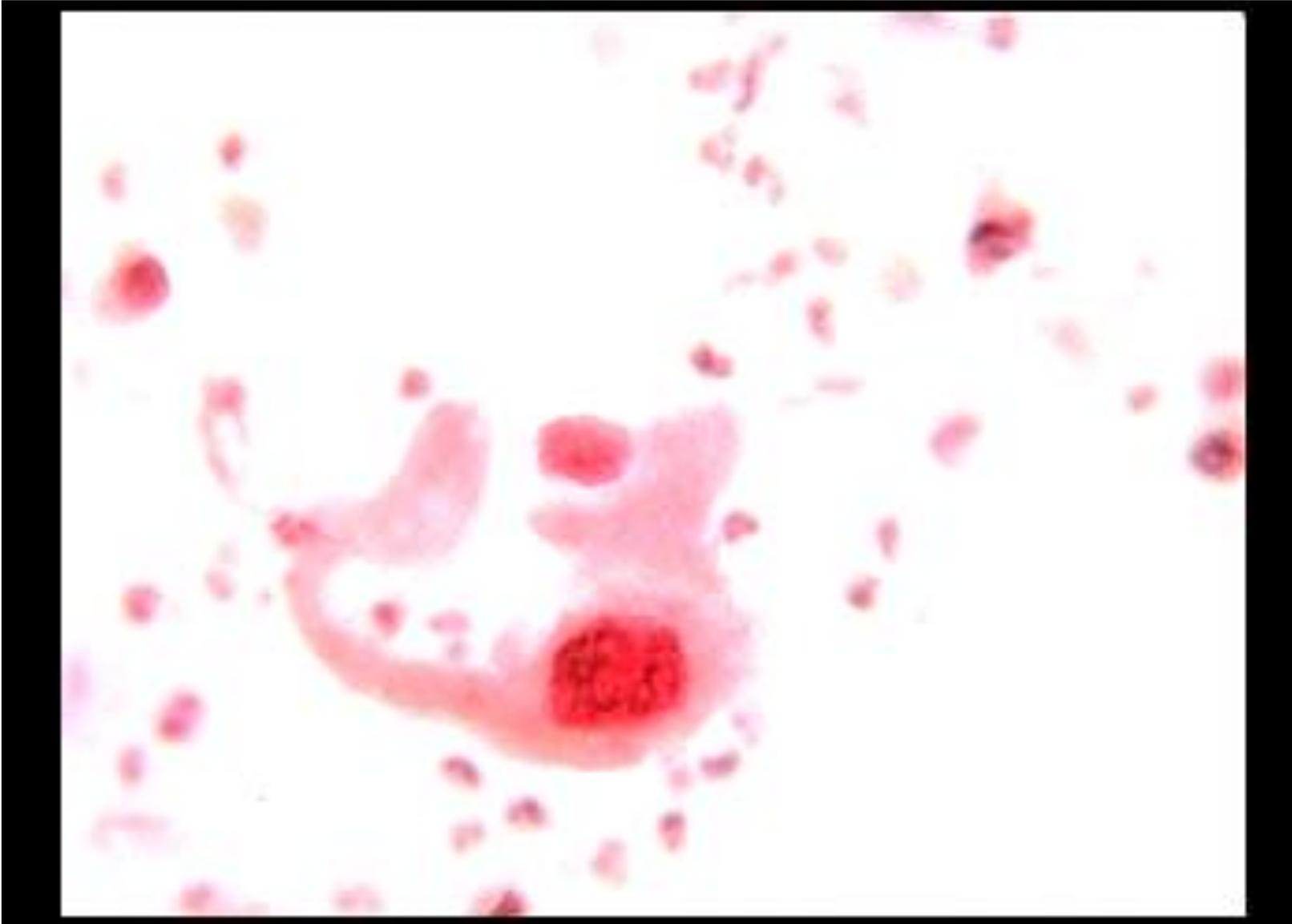
Epitelio bronchiale normale



DISPLASIA SQUAMOSA



CITOLOGIA : BAL o liquido di lavaggio bronchiale

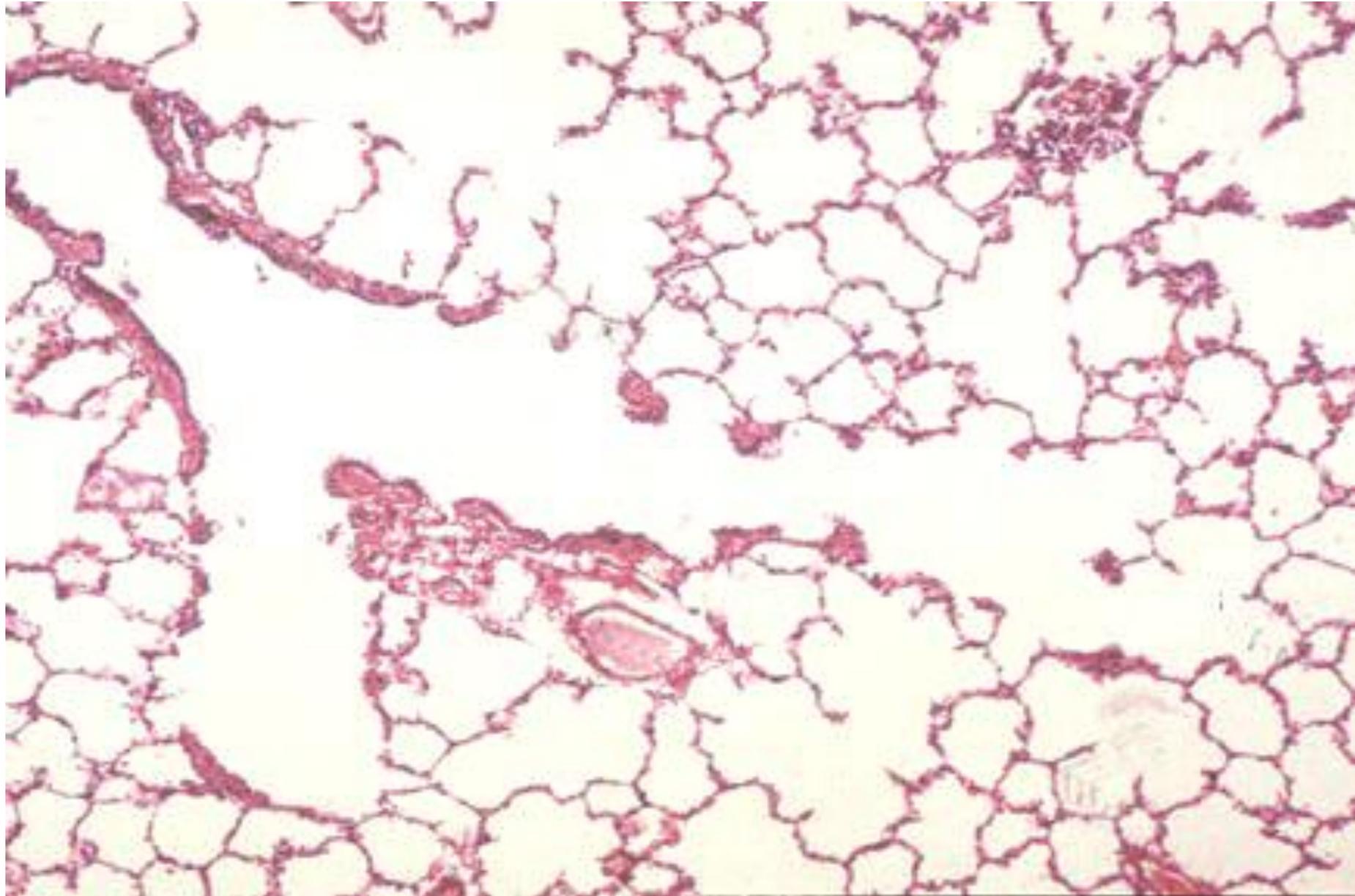


LESIONI PRE-NEOPLASTICHE dei PNEUMOCITI

Iperplasia adenomatosa atipica: focus ben demarcato di pneumociti di II tipo o di cellule di Clara negli alveoli o nei bronchioli con atipie citologiche

Aree di iperplasia adenomatosa si ritrovano dal 5 al 23% degli adenocarcinomi e sono multiple nel 7% dei casi

Tessuto polmonare normale



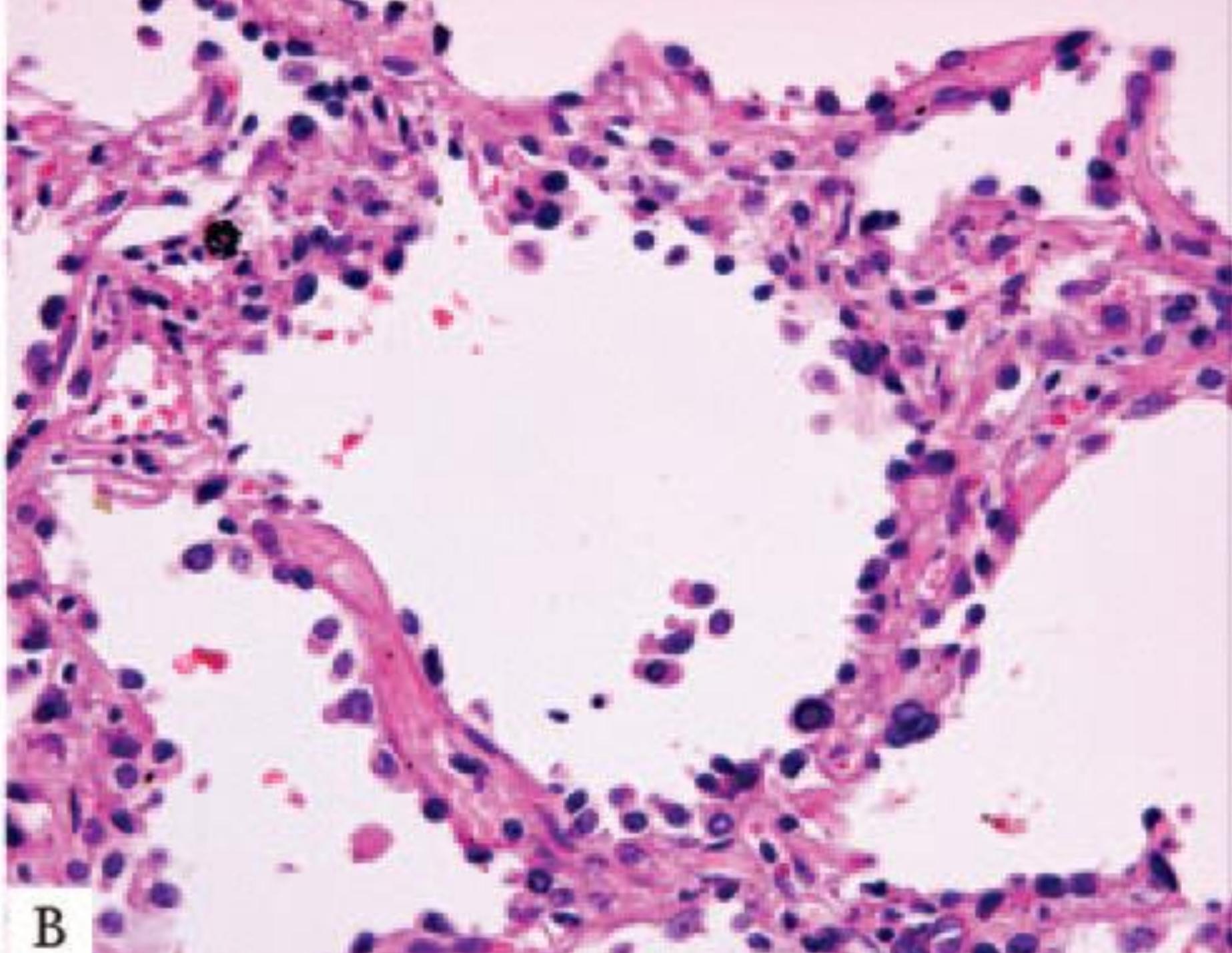
IPERPLASIA ADENOMATOSA ATIPICA

3 mm

PARETI ALVEOLARI ISPESSITE

A





B

Nella iperplasia adenomatosa atipica

le pareti alveolari sono lievemente ispessite, e le lesioni sono piccole

si vedono spazi tra le cellule, vi è atipia moderata e spesso ci sono

inclusioni intranucleari

LESIONI PRE-NEOPLASTICHE delle CELLULE NEUROENDOCRINE

Iperplasia neuroendocrina idiopatica diffusa (rara)

Aumento del numero delle cellule neuroendocrine di natura idiopatica

NON sempre progredisce e morfologicamente non è possibile predire se lo farà

COSA SONO LE CELLULE NEUROENDOCRINE ?

Cellule di origine **neuro-ectodermica o endodermica** capace di sintetizzare, immagazzinare e secernere mediatori biologici e/o i loro precursori con modalità endocrina, paracrina e autocrina, nonché enzimi di tipo neuronale e neurotrasmettitori

possono essere singole (o in clusters detti corpi neuropiteliali), in questo caso si parla di **sistema neuroendocrino diffuso** o essere raggruppate e costituire il **sistema neuroendocrino localizzato**

- Sistema NeuroEndocrino Diffuso (DNES)

Sistema neuroendocrino gastro-entero-pancreatico (GEP)

- *Tratto gastroenterico*
- *Pancreas endocrino*

Apparato respiratorio

Rene ed apparato urogenitale

Cute

Miocardio

Tessuto linfatico

Sistema neuroendocrino localizzato

Ipofisi

Tiroide **(solo le cellule parafollicolari)**

Paratiroidi

Ipotalamo

Surrenali (midollare)

Gangli

Paragangli

Glomo Carotideo

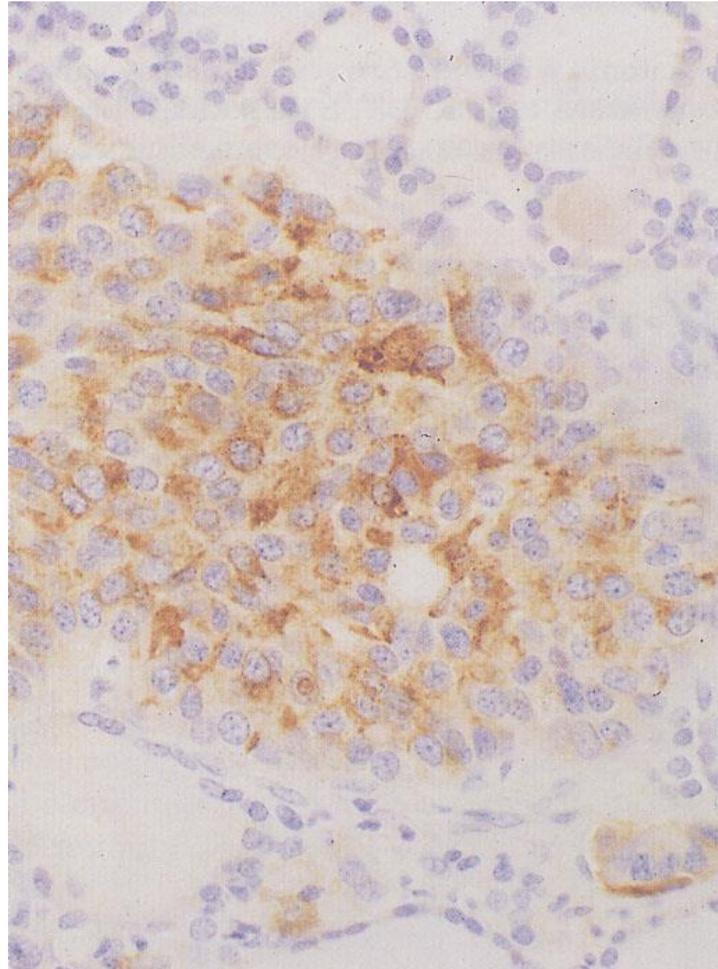
Epifisi

Le cellule neuroendocrine contengono granuli

Nei granuli vi sono proteine comuni a tutte le cellule neuroendocrine che vengono utilizzate come markers aspecifici nella immunostochimica e proteine specifiche per un dato tipo di cellula

Per esempio le cellule neuroendocrine dello stomaco producono gastrina

cromogranina



Markers neuroendocrini aspecifici

	Sensibilità	Specificità
Cromogranina	60-90%	68-100%
Enolasi neurospecifica	38-78%	30-85%

(questi sono quelli che si usano ve ne sono molti altri)

Markers

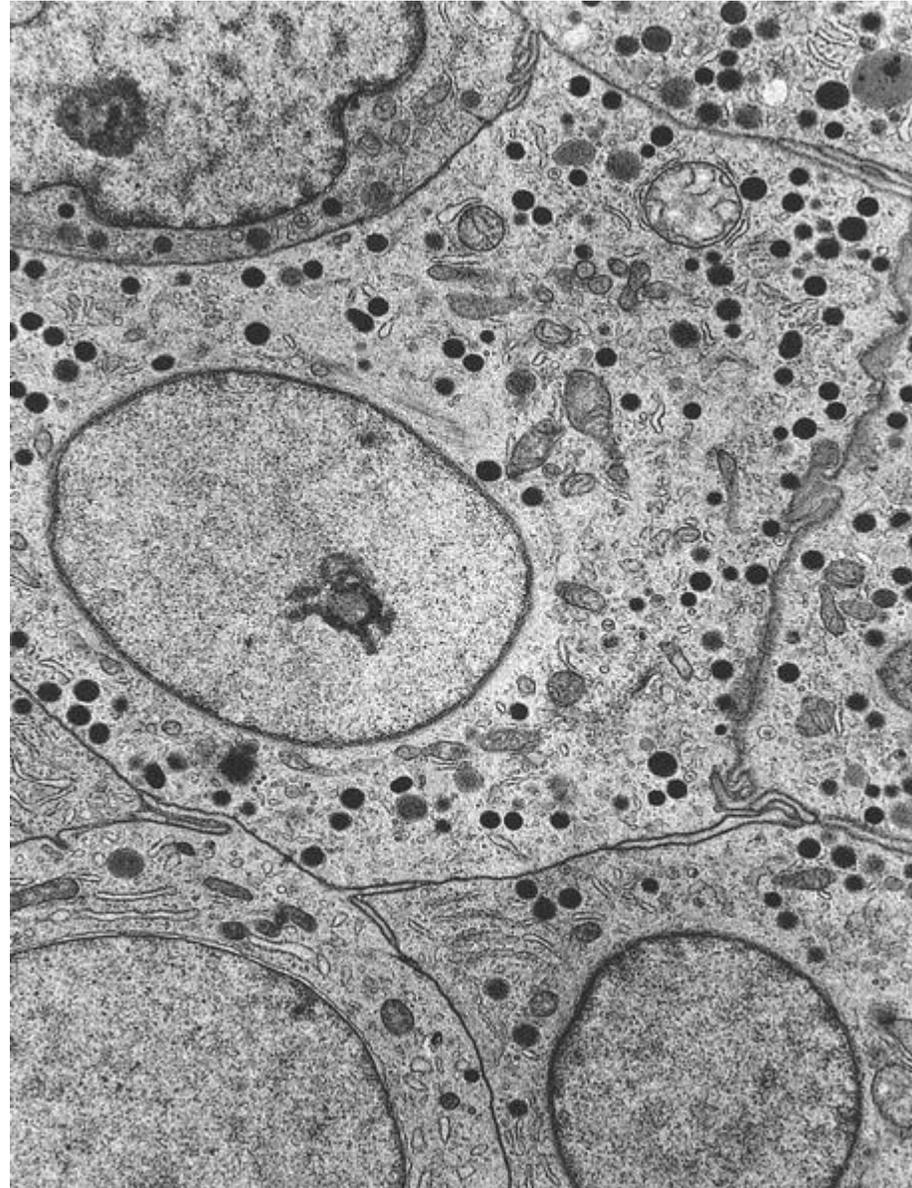
S P E C I F I C

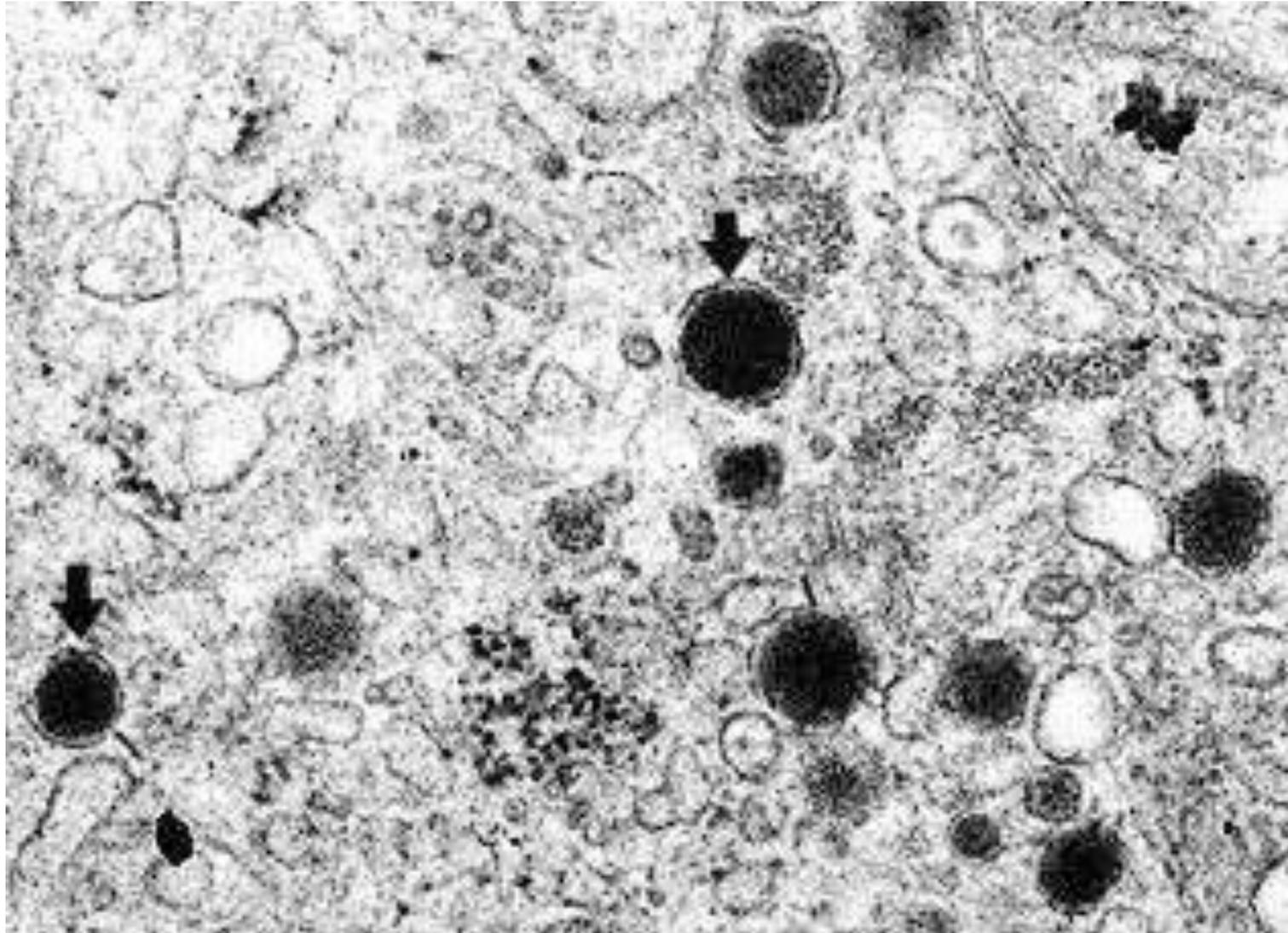
Neoplasia	Sostanza secreta
carcinoide EC	serotonina, sostanza P, VIP
carcinoide ECL	istamina, 5-HTP, ACTH, epinefrina, MSH
insulinoma	insulina, polipeptide pancreatico
gastrinoma	gastrina, polipeptide pancreatico
glucagonoma	glucagone, polipeptide pancreatico, calcitonina
VIP-oma	VIP, polipeptide pancreatico
somatostatinoma	somatostatina
PP-oma	polipeptide pancreatico, VIP
neurotensinoma	neurotensina, VIP, polipeptide pancreatico, calcitonina, enkefalina
enteroglucagonoma	enteroglucagone
bombesinoma	GRP, polipeptide pancreatico, calcitonina, serotonina
ca midollare tiroideo	calcitonina
microcitoma polmonare	ACTH, PTH, calcitonina
feocromocitoma	catecolamine

D I A G N O S T I C I

Microscopia elettronica

Cellule
neuroendocrine
con numerosi
granuli





Sono granuli con il core elettrondenso e alone chiaro

PROLIFERAZIONI E TUMORI NEUROENDOCRINI

Iperplasie:

1) Iperplasia neuroendocrina secondaria a infiammazioni

2) Iperplasia neuroendocrina idiopatica diffusa, rara

questa è una lesione preneoplastica anche se non sempre progredisce e morfologicamente non è possibile predire se lo farà

Tumori : problema delle classificazioni (carcinoidi intestinali)

FUNZIONANTI

NON FUNZIONANTI

I tumori neuroendocrini possono avere la capacità di produrre numerose amine, peptidi, ormoni e sostanze biologicamente attive oppure il livello dei peptidi è basso o i peptidi sono non funzionanti.

I tumori funzionanti

**possono essere annunciati dalle
sindromi paraneoplastiche**

la più nota è la sindrome da carcinoide

**S
I
N
D
R
O
M
E
d
a
C
A
R
C
I
N
O
I
D
E**

Manifestazioni cliniche	Frequenza (%)	Possibili mediatori
<i>Diarrea</i>	76	5-HT, istamina, prostaglandine, VIP, glucagone, gastrina, calcitonina
<i>Flushing</i>	80	5-HT, 5-HTP, callicreine, neurochinine, istamina, sostanza P, prostaglandine
<i>Dispnea (broncocostrizione)</i>	26	5-HT, istamina
<i>Cardiopatìa</i>	53	5-HT
cuore destro	40	
cuore sinistro	13	
<i>Dermatopatia</i>	7	deplezione di triptofano (aumentata sintesi 5-HTP)
<i>Dolori addominali*</i>	51	fibrosi retro-peritoneale *effetto diretto massa tumorale

Sindrome	Tipo cellulare	Manifestazioni cliniche	% malignità	Mediatori
s. carcinoide	EC-cell EC _L -cell	flushing, diarrea ipotensione, asma	100	5-HT istamina peptidi vari
s. Zollinger-Ellison	cell.insulari non- β cell.G duodenali	ulcera peptica diarrea	70	gastrina
insulinoma	cell.insulari β	ipoglicemia	10	insulina
VIPoma	cell. insulari D ₁	diarrea, ipo-k+ ipocloridria	60	VIP
glucagonoma	cell.insulari α	DM, eritema necrotizzante migrante, glossite	>75	glucagone
somatostatinoma	cell.insulari D	DM, diarrea, steatorrea colelitiasi	70	somatostatina
hGH-RHoma	cell.insulari non- β	acromegalia	?	hGH-RH
PP-oma	cell.insulari PP	eritema necrotizzante (raro)	?	PP
s. da ACTH/CRH	cell.insulari non- β	s. di Cushing	?	CRH
neurotensinoma	cell.insulari non- β	diarrea	?	neurotensina

In Italia si registrano 3-4 nuovi casi ogni 100.000 persone in un anno, il che equivale a circa 2.500-2.700 nuovi casi ogni anno.

Sono tumori a bassa incidenza (numero di nuovi casi in un anno), ma ad alta prevalenza (numero di casi presenti in una popolazione in un dato momento) poiché spesso i pazienti sono "lungo-sopravvivenenti" ovvero convivono a lungo con la malattia.

I T. neuroendocrini colpiscono

**70% dei casi il sistema gastro-
entero-pancreatico**

**20 % dei casi apparato
respiratorio**

10% in altre sedi

CLASSIFICAZIONE

GRADO	POLMONE (WHO)	TUTTE LE SEDI
basso	carcinoide tipico	carcinoma neuroendocrino grado 1
intermedio	carcinoide atipico	carcinoma neuroendocrino grado 2
alto	carcinoma a piccole cellule	carcinoma neuroendocrino grado 3 a piccole cellule
alto	carcinoma a grandi cellule	carcinoma neuroendocrino grado 3 a grandi cellule

Il grado è dato dal **NUMERO DELLE MITOSI**

Un tumore può sembrare ben differenziato ma il suo comportamento **NON** è prevedibile in base al suo aspetto istologico

CARCINOMI NEUROENDOCRINI DEL POLMONE

Sono più spesso “low grade” e sono l’ 1- 5 % dei tumori polmonari.

Giovani (40 anni), entrambi i sessi, nel 20-40% dei casi non fumatori

MACRO

Centrali: possono essere **polipoidi**, circa 3-4 cm e **ricoperti di mucosa sana** oppure crescere intorno al bronco **a collare**

Periferici: crescono come **noduli**

MICRO

Gruppi di cellule disposte in trabecole, nastri o rosette , separate da un delicato stroma fibrovascolare, contorni regolari, nucleo rotondo e

uniforme, citoplasma chiaro o lievemente eosinofilo, l’aspetto è simile a quello dei carcinoidi intestinali

CA NEUROENDOCRINO Grado 1 (CARCINOIDE TIPICO)

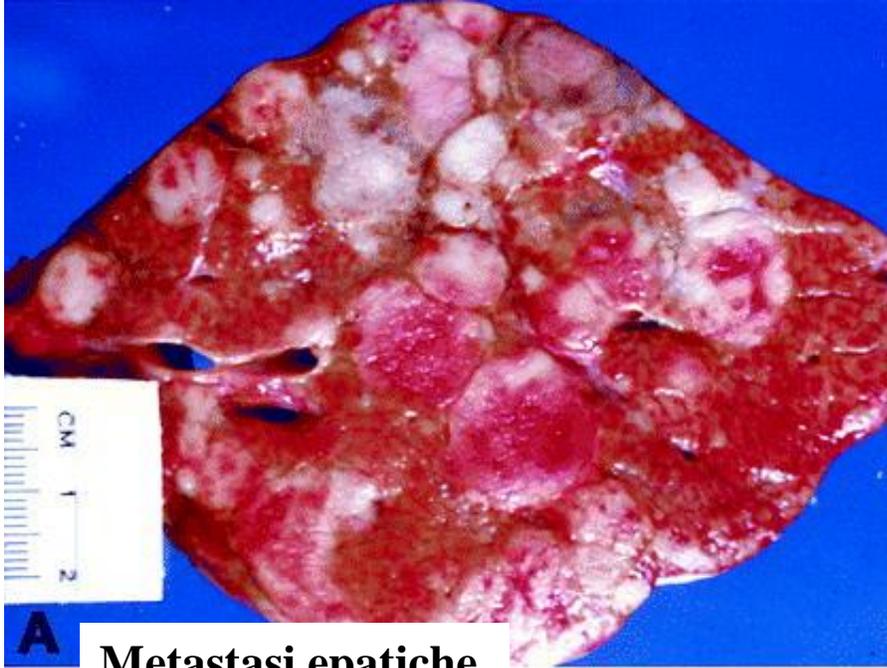
< di 2 mitosi per 10 campi ad alto ingrandimento
senza necrosi, positivo per marker TTF1
(thyroid transcription factor1)

CA NEUROENDOCRINO G rado2 (CARCINOIDE ATIPICO)

> 2 mitosi/10 campi ad alto ingrandimento e necrosi,
morfologicamente meno differenziati TTF1 negativo

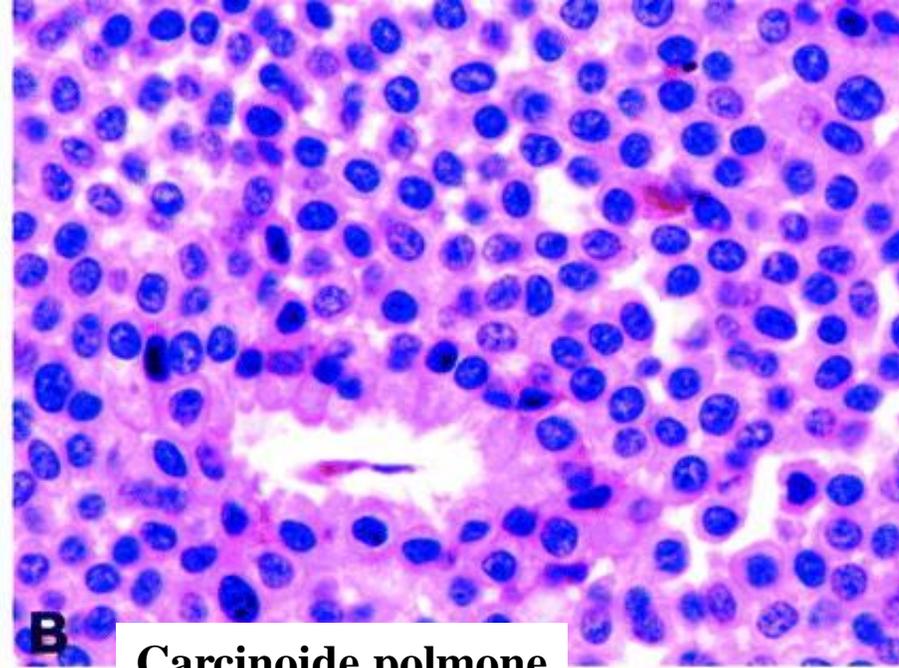
**In genere nei tipici non ci sono mutazioni della p53
o alterazioni del rapporto Bcl2/Bax** che sono proteine che
controllano l'apoptosi

Prognosi tipici 87% a 10 anni, atipici 56% a 5 anni e 35% a 10 anni



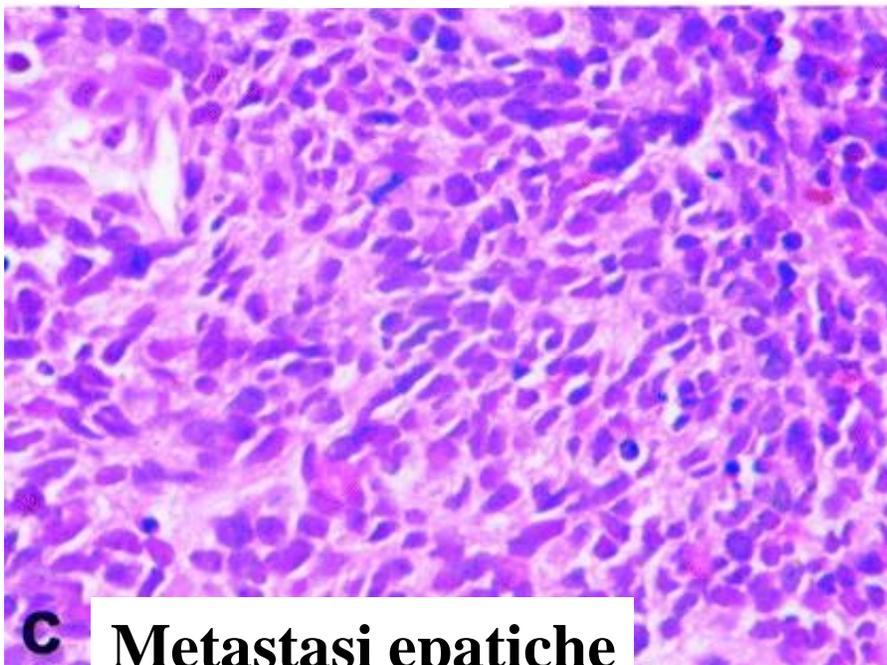
A

Metastasi epatiche



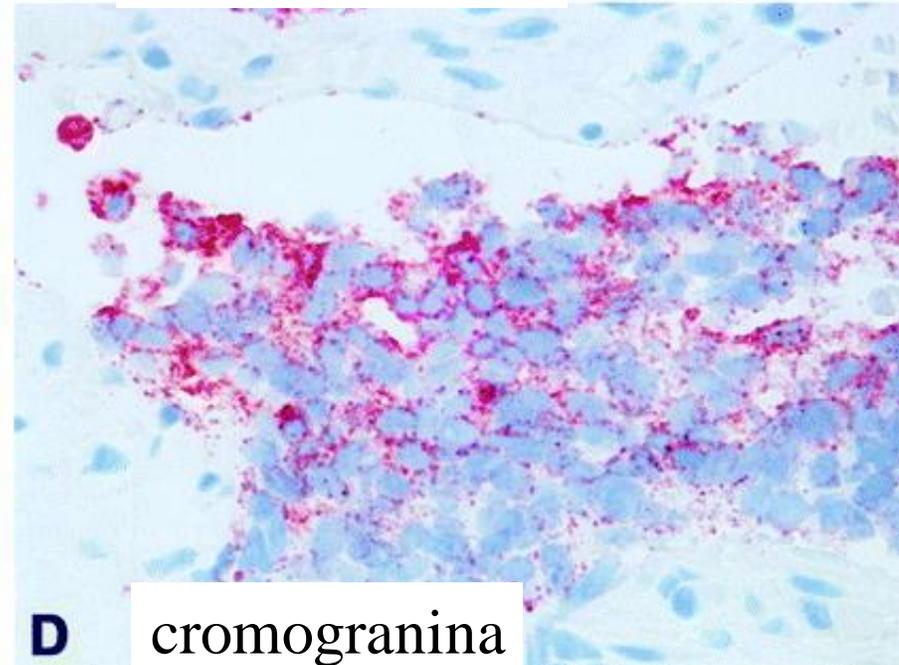
B

Carcinoide polmone



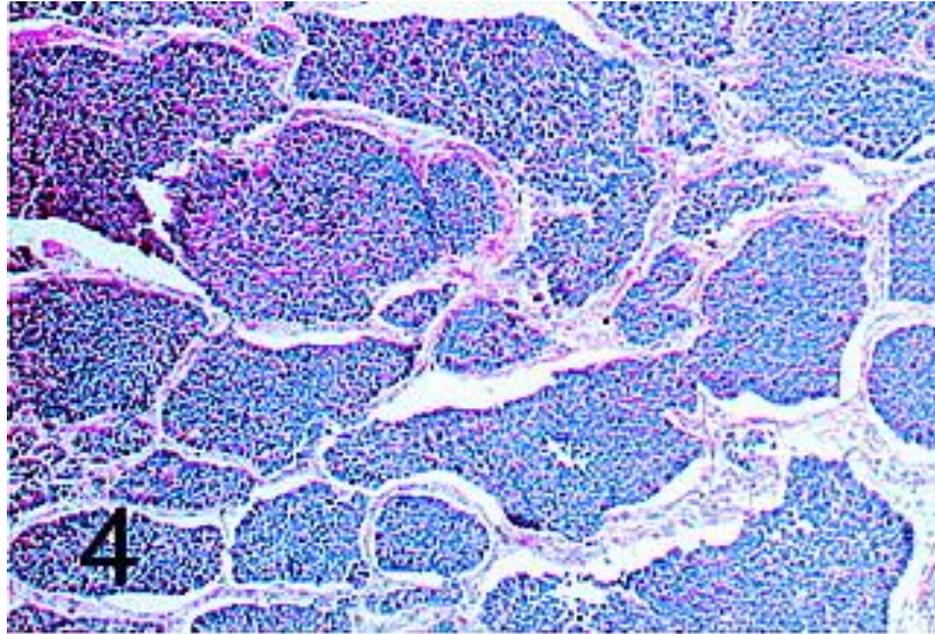
C

Metastasi epatiche

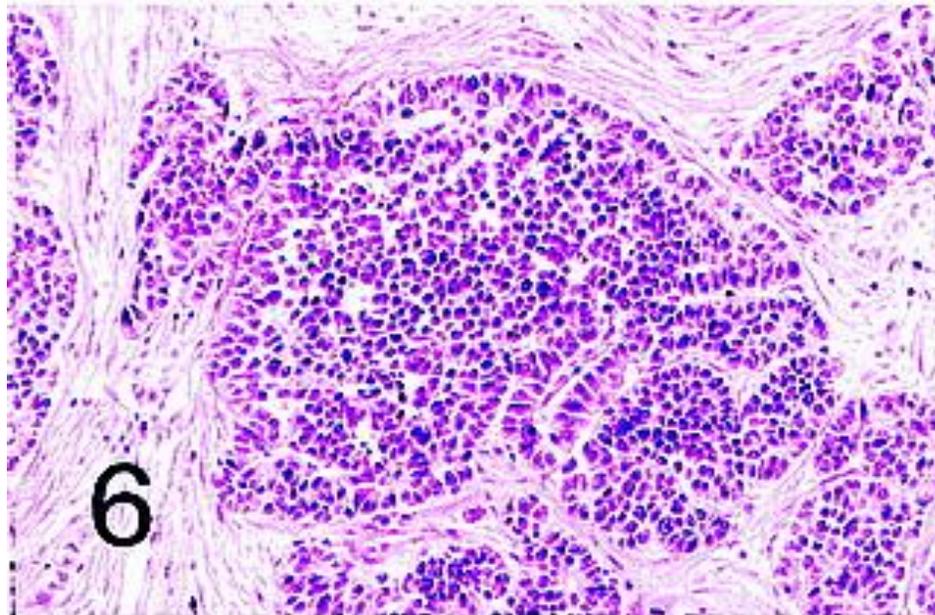


D

cromogranina



Carcinoide
moderatamente
differenziato,HE



Carcinoide
scarsamente
differenziato,HE

TUMORI MALIGNI DEL POLMONE

Fumo 87% dei tumori si osserva in fumatori

Average smoker: > del rischio di 10 volte rispetto a non fumatori

Heavy smoker: > rischio di 60 volte
(> 40 sigarette)

Radiazioni ionizzanti

Asbesto

Inquinamento atmosferico in particolare il radon, gas radioattivo
prodotto del decadimento dell'uranio

TUMORI MALIGNI DEL POLMONE

NON A PICCOLE CELLULE A PICCOLE CELLULE

**TUMORI
EPITELIALI**

MICROCITOMA

ovvero

TUMORE NEUROENDOCRINO

DI GRADO 3

Dovete sapere questa classificazione perché i tumori del polmone sono frequenti e la terapia di questi due gruppi di tumore è diversa

Non a piccole cellule

Squamoso
Adenocarcinoma
A grandi cellule

A piccole cellule

Microcitoma o
ca neuroendocrino di grado 3

ANATOMIA PATOLOGICA MACROSCOPICA

Centrale

cioè verso l'ilo del polmone

Periferico

cioè verso la pleura

L'adenocarcinoma è di solito periferico

Possono essere masse che occludono il bronco o che infiltrano la parete del bronco e possono essere ulcerate

**Si è recentemente dimostrato che il ca squamocellulare
e l'adenocarcinoma sono diversi a livello molecolare
e rispondono a terapie diverse ed è quindi divenuto
molto più importante distinguerli**

TTF1 = thyroid transcription factor

Il TTF1 nella tiroide controlla l'espressione della tireoglobulina e della perossidasi

E' espresso nel polmone e controlla l'espressione del surfactante nei pneumociti di II tipo e di proteine secretorie delle cellule di Clara

Gli adenocarcinomi polmonari sono TTF1 positivi ma gli altri adenocarcinomi NO (es. quelli intestinali) e quindi questo consente di poterli differenziare nel caso ad esempio di metastasi quando il tumore di origine non è evidente

Diagnosi differenziale tra adenocarcinoma e carcinoma squamoso

Si impone in caso di tumori indifferenziati

Il marker più importante per l'adenoca è il TTF1

L'adenocarcinoma è PAS + si fa sempre il PAS-DIASTASI
o il mucicarminio la Citocheratina 7 è spesso positiva

Il marker più importante per il ca squamoso è la p63

che però è positiva in un terzo dei casi di adenocarcinoma.

Se il tumore è positivo sia per TTF1 che per p63 in assenza di morfologia di squamoso si farà diagnosi di adenocarcinoma

Se nel tumore sono positive aree diverse per markers di adenoca e di ca squamoso allora può trattarsi di un carcinoma adeno-squamoso

Prima tra i tumori “non a piccole cellule” vi era un tumore denominato carcinoma bronchioloalveolare o BAC che poteva essere non mucinoso o mucinoso, quello mucinoso aveva prognosi peggiore

Questo tipo di tumore ha una particolarità importante: le cellule proliferano lentamente all'interno degli alveoli e dei bronchioli **SENZA INFILTRARE** dando radiologicamente un quadro di polmonite (per cui è necessario fare la diagnosi differenziale con la polmonite)

Questo tipo di crescita viene denominato “crescita lepidica” cioè come i lepidotteri (farfalle) e si pensava che il BAC fosse una forma di adenocarcinoma del polmone separata dalle altre e meno aggressiva. **Si è visto che in realtà si tratta di una fase precedente all'adenocarcinoma invasivo per cui è stato tolto dalla classificazione generale ed è stata elaborata la nuova classificazione degli adenocarcinomi del polmone**

TABLE 3. Categories of New Adenocarcinoma Classification Where Former BAC Concept was Used

1. Adenocarcinoma in situ (AIS), which can be nonmucinous and rarely mucinous
 2. Minimally invasive adenocarcinoma (MIA), which can be nonmucinous and rarely mucinous
 3. Lepidic predominant adenocarcinoma (nonmucinous)
 4. Adenocarcinoma, predominantly invasive with some nonmucinous lepidic component (includes some resected tumors, formerly classified as mixed subtype, and some clinically advanced adenocarcinomas formerly classified as nonmucinous BAC)
 5. Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)
-

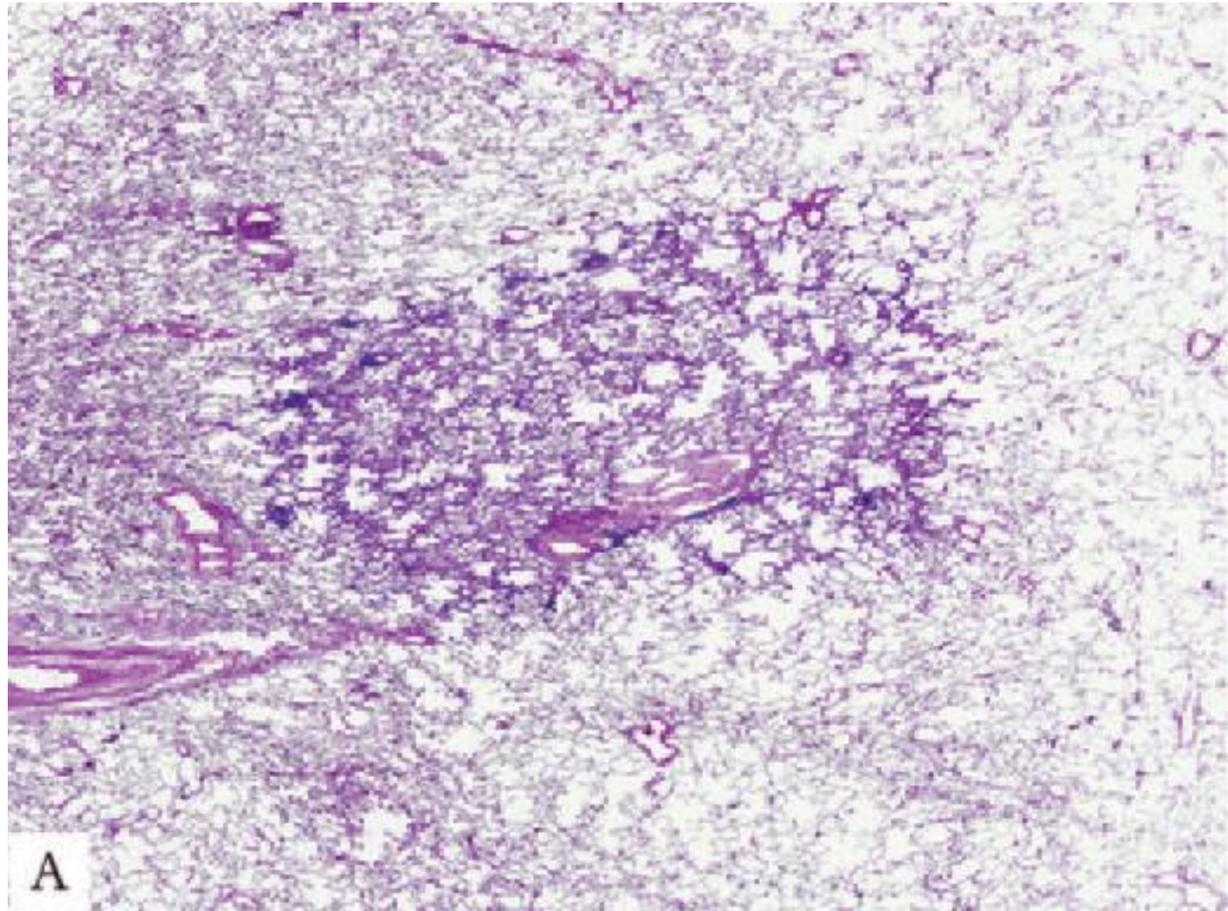
BAC, bronchioloalveolar carcinoma.

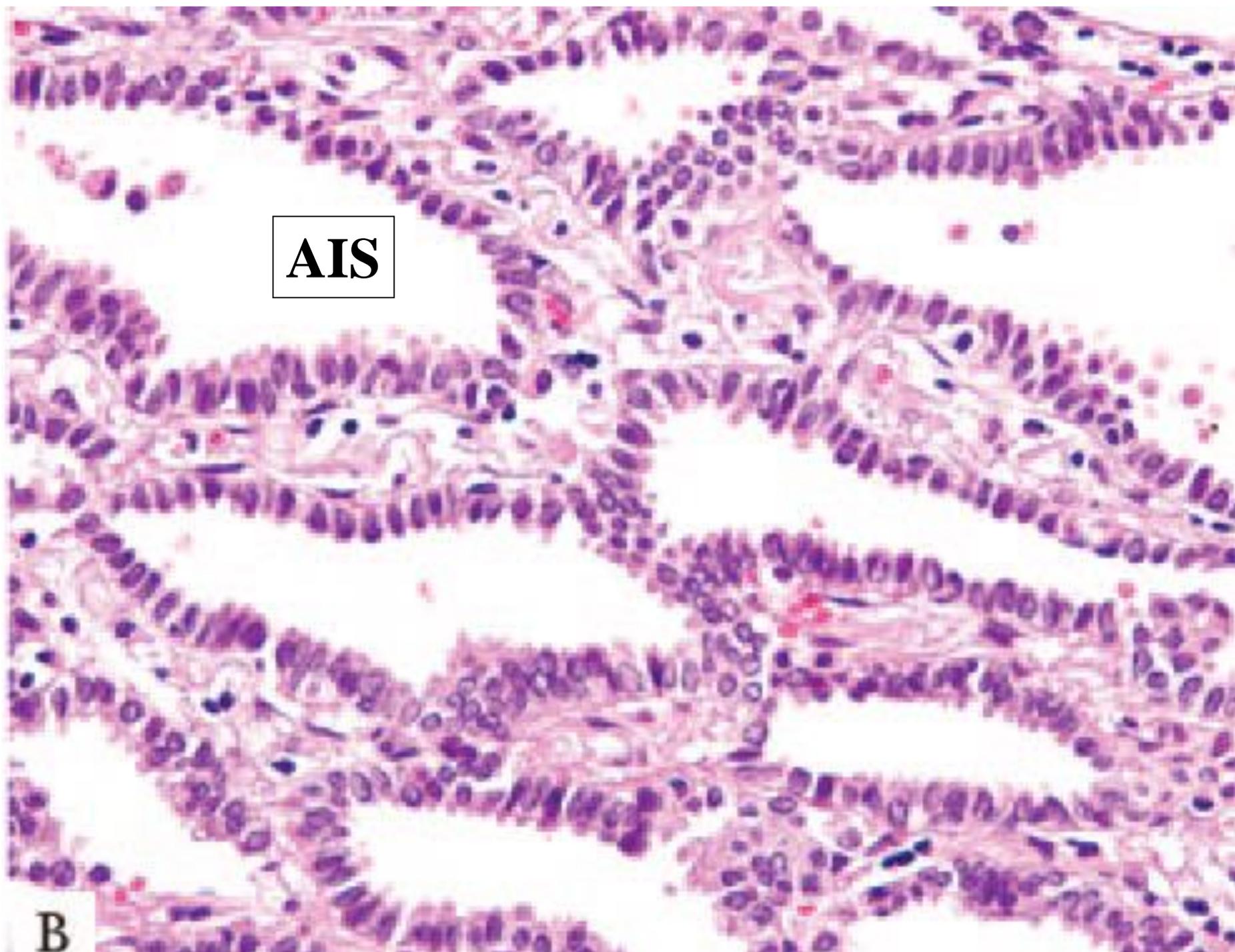
Quindi si può riconoscere un precursore dell'adenocarcinoma invasivo che ha una crescita di tipo "lepidico"

Adenocarcinoma in situ o AIS

Adenoca in situ < **3 cm**, pattern di crescita lepidico, nel 99% dei casi non mucinoso non vi è atipia nucleare ma i pneumociti sono atipici e vi è pattern di crescita lepidico. Per definizione un ca in situ non supera la membrana basale

Adenocarcinoma in situ o AIS





AIS

B

Adenoca minimamente invasivo o MIA

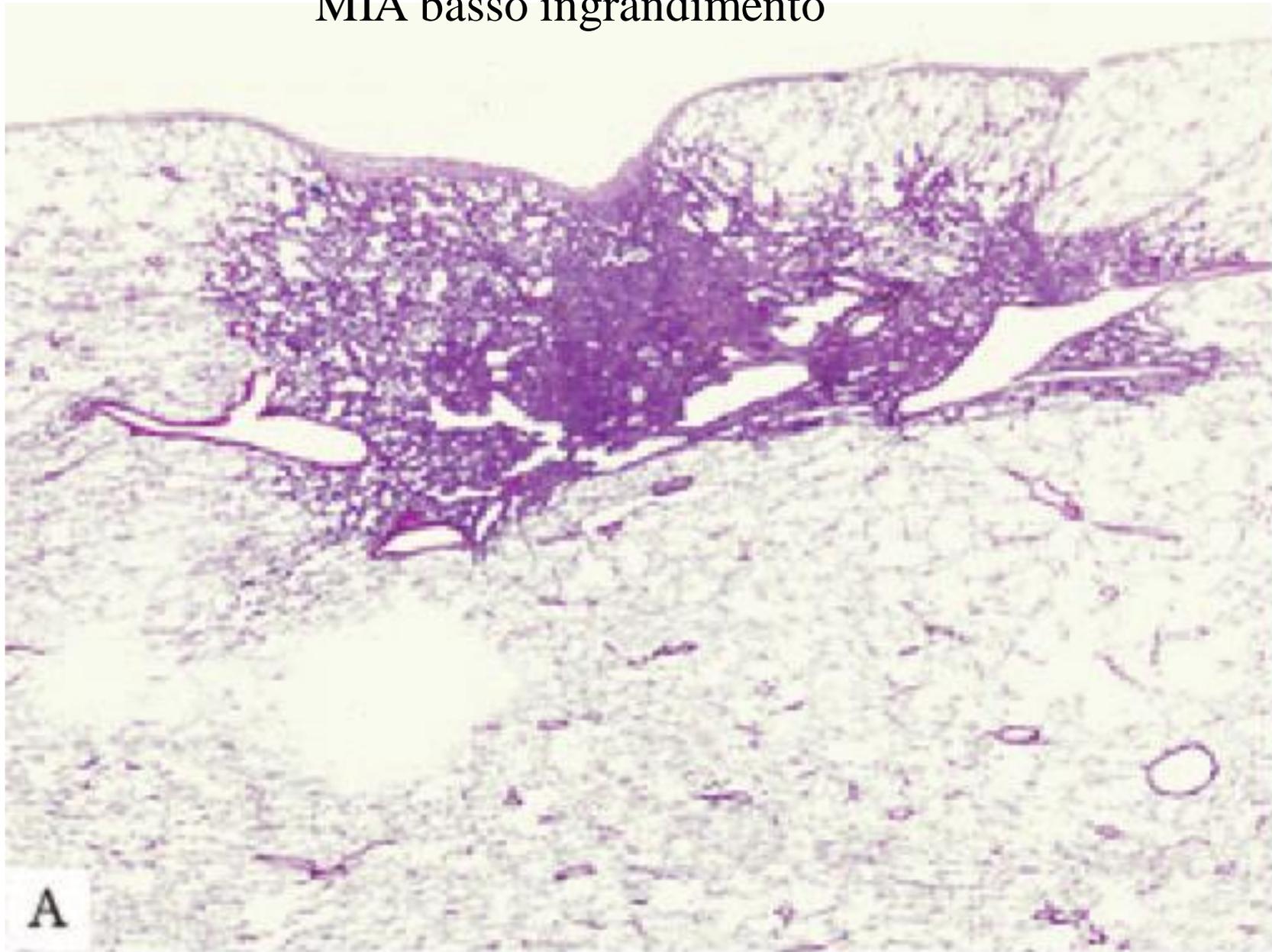
Deve essere sempre ≤ 3 cm, con crescita lepidica, può presentare

una o più aree di invasione, di queste la più grande può arrivare

ma non deve superare i 5 mm, nel 99% dei casi non è mucinoso

Sopravvivenza di quasi il 100% dei casi a 5 anni.

MIA basso ingrandimento



Adenocarcinoma invasivo = focus di invasione > di 5 mm

Si dice invasivo anche se il pattern è tutto lepidico ma vi è

- 1) Invasione di linfonodi
- 2) Invasione di pleura
- 3) Foci di necrosi

TNM non dovete saperlo ma capirlo

T1 < 3cm

T2 3-7 cm

T3 > 7 cm o con invasione pleura pericardio bronco principale
o con atelettasia del polmone

T4 invasione mediastino cuore grossi vasi trachea ecc

N0

N1 linfonodi ilari o ipsilaterali del bronco

N2 linfondi ipsilaterali del mediastino o della subcarena

N3 linfonodi controlaterali

M0

M1

PROGNOSI

Stadio IA T1N0M0

Stadio IB T2 N0 M0

Stadio IIA T1 N1M0

Staging:

stadio IA sopravvivenza a 5 anni 73%,

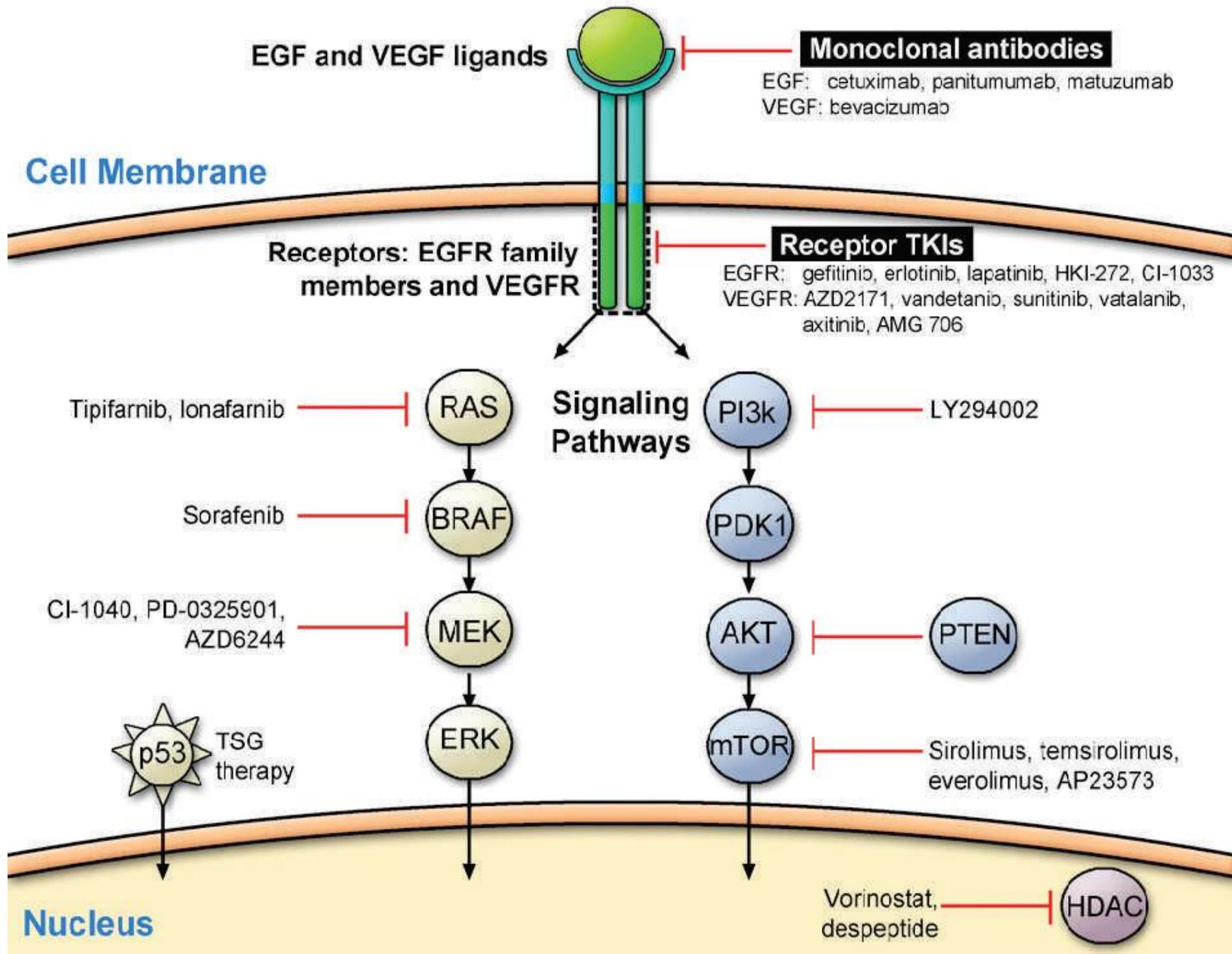
IB 58%

IIA 36%

GLI ADENOCARCINOMI DEL POLMONE POSSONO IN ALCUNI CASI PRESENTARE MUTAZIONI DEL RECETTORE PER L'EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGFR) ATTIVANTI PATHWAY BIOCHIMICI CHE FAVORISCONO LA PROLIFERAZIONE E LA SOPRAVVIVENZA DELLE CELLULE NEOPLASTICHE

EGFR E ALTRI RECETTORI DI MEMBRANA DELLE CELLULE
NEOPLASTICHE SONO TIROSINO-CHINASI COME AD ESEMPIO
IL RECETTORE PER IL VASCULAR ENDOTHELIAL
GROWTH FACTOR CHE FAVORISCE LA NEOANGIOGENESI

QUINDI POSSIAMO USARE FARMACI INIBITORI DELLE
TIROSINO-CHINASI PER BLOCCARE I SEGNALI BIOCHIMICI
CHE PARTONO DA QUESTI RECETTORI



EGF and VEGF ligands

Monoclonal antibodies

EGF: cetuximab, panitumumab, matuzumab
 VEGF: bevacizumab

Cell Membrane

Receptors: EGFR family members and VEGFR

Receptor TKIs

EGFR: gefitinib, erlotinib, lapatinib, HKI-272, CI-1033
 VEGFR: AZD2171, vandetanib, sunitinib, vatalanib, axitinib, AMG 706

Signaling Pathways

Tipifarnib, lonafarnib

RAS

PI3k

LY294002

Sorafenib

BRAF

PDK1

CI-1040, PD-0325901, AZD6244

MEK

AKT

PTEN

p53 TSG therapy

ERK

mTOR

Sirolimus, temsirolimus, everolimus, AP23573

Nucleus

Vorinostat, despeptide

HDAC

MUTAZIONI del RECETTORE per EGF

**Dal 10 al 20% degli adenocarcinomi sono presenti mutazioni attivanti EGF recettore
In questi casi sono efficaci specifici inibitori delle tirosinochinasi (gefitinib erlotinib)**

In questi casi la tecnica migliore per identificare le mutazioni è la PCR seguita da sequencing perché trova tutte le mutazioni

**I pazienti con queste mutazioni se trattati con questi farmaci
hanno una sopravvivenza senza progressione significativamente maggiore,
meno effetti collaterali, rimozione dei sintomi con
migliore qualità della vita e forse anche aumento della sopravvivenza in assoluto**

CONCETTO DI RESISTENZA PRIMARIA

E' UN CONCETTO CLINICO

E' PRESENTE AL MOMENTO DELLA TERAPIA

IL PAZIENTE NON RISPONDE

.

LA RESISTENZA PUO' QUINDI ESSERE PRIMARIA E CIOE'
ESSERE PRECEDENTE ALLA TERAPIA
O SECONDARIA, CIOE' INSORGERE DOPO L'INIZIO
DELLA TERAPIA

Mutazioni che conferiscono resistenza primaria

Le mutazioni di molecole che funzionano a valle dell'EGF recettore recettore sono associate a resistenza agli inibitori delle tirosinokinasasi

KRAS

Le mutazioni di KRAS sono caratteristiche dell'adenoca invasivo variante mucinosa che però non ha virtualmente mai mutazioni attivanti dell'EGF recettore. In questa variante naturalmente non si somministrano inibitori di EGF recettore.

Se è presente mutazione di K RAS in adenocarcinomi che hanno mutazioni dell' EGF recettore tale mutazione conferisce resistenza primaria agli inibitori delle tirosinokinasasi

Esistono mutazioni che conferiscono resistenza secondaria al trattamento cioè una resistenza che si stabilisce dopo una iniziale risposta agli inibitori

Nel 50% dei casi mutazione T790M nell'EGF recettore

TIROSINA codone 790  **METIONINA**

**Nel 30% dei casi amplificazione del MET
(mesenchymal-epithelial transition gene)**

Una scoperta importante è stata l'osservazione che queste mutazioni sono presenti

PRIMA del trattamento e il trattamento quindi le seleziona

La kinasi ALK

Nell'1-7% degli adenocarcinomi in pazienti asiatici non fumatori è presente una delezione con inversione del gene ALK che viene a fondersi con il gene EML4 generando una proteina di fusione. Si tratta quindi di una traslocazione identificabile con la FISH break-apart (vedi lezione biologia molecolare)

Questi pazienti rispondono agli inibitori di ALK cioè vi è sensibilità al crizotinib

In 2 casi/150 è stata ottenuta una remissione completa. Di solito è uno dei due alleli ad avere la translocazione.

PEMETREXED

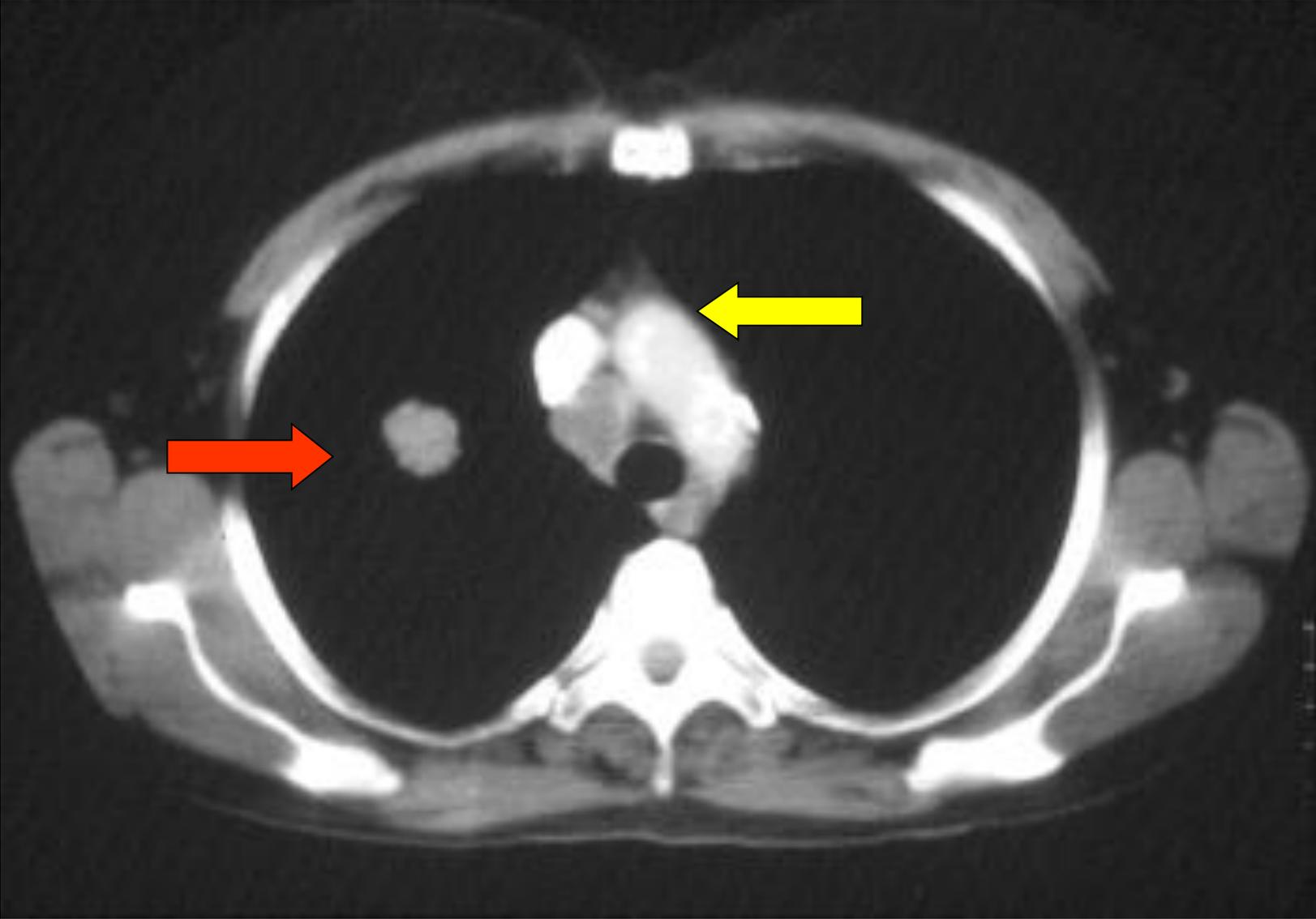
Farmaco usato nella terapia di carcinomi in fase avanzata da solo o in combinazione con altri farmaci è un inibitore di molteplici enzimi coinvolti nella sintesi del DNA

**I pazienti con adenocarcinoma
ma non quelli con carcinoma squamoso
beneficiano di questa terapia**

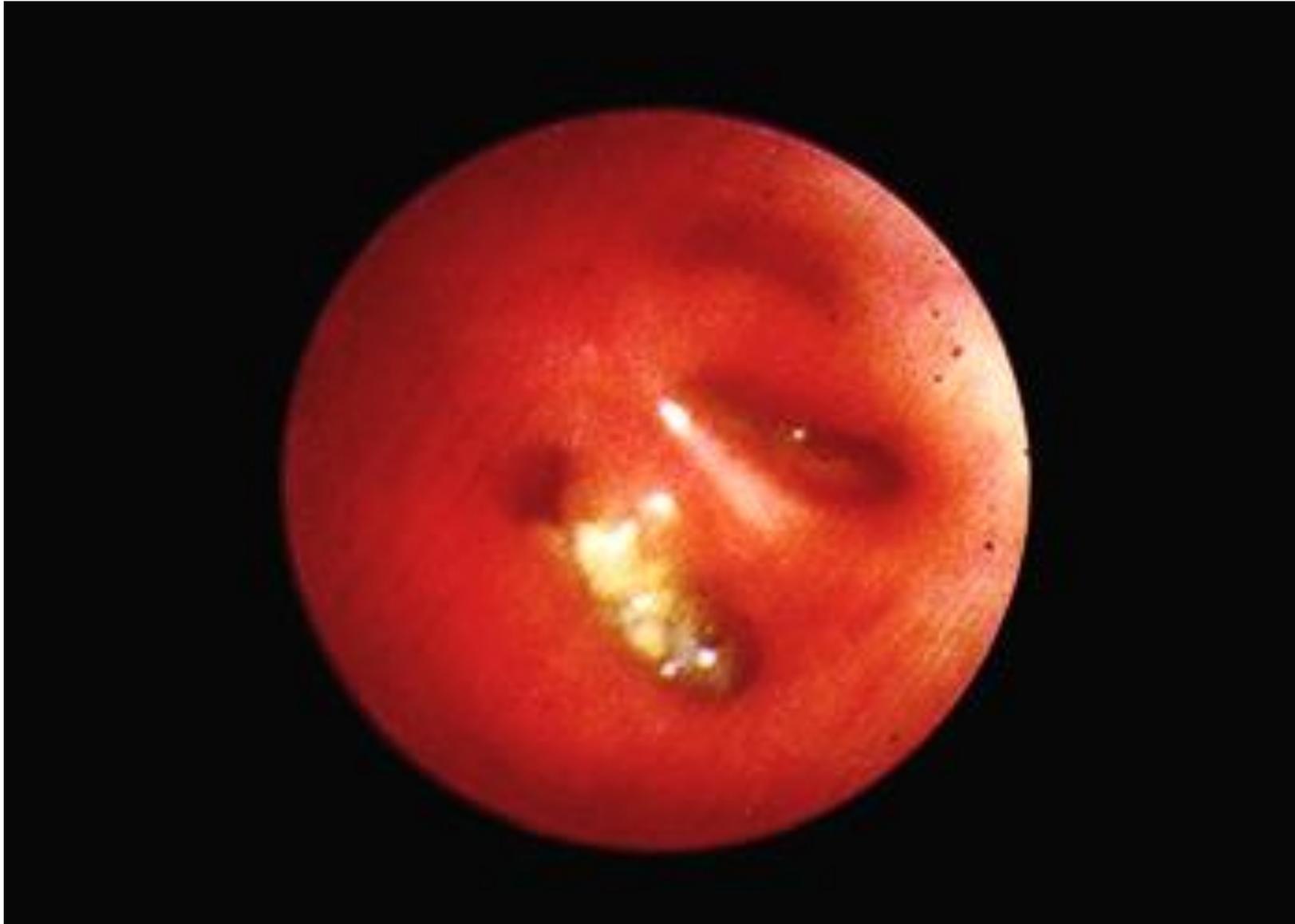
BEVACIZUMAB

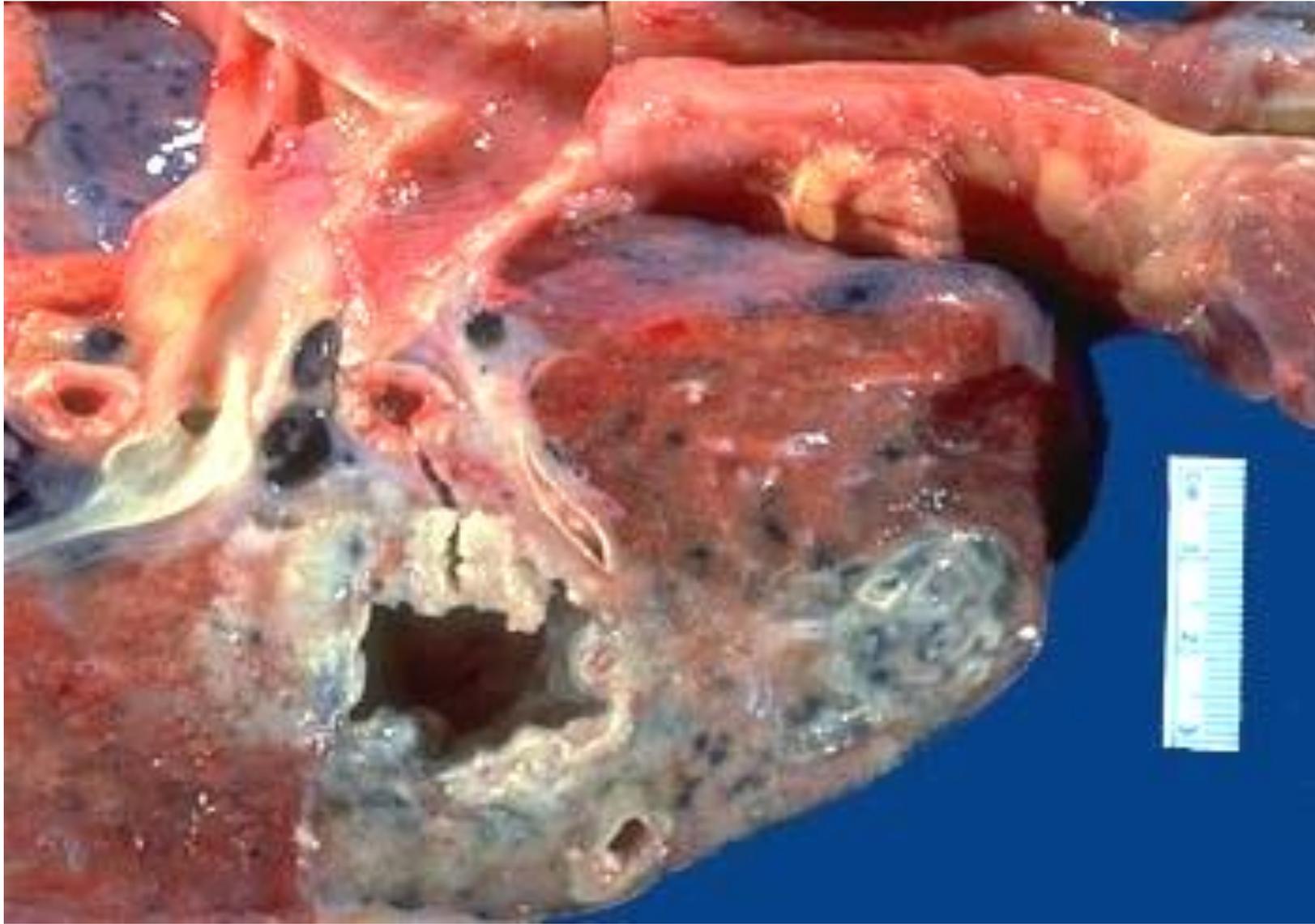
Anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato che neutralizza il VEGF. Il VEGF promuove l'angiogenesi, quindi il bevacizumab ostacola l'angiogenesi (può essere associato al pemetrexed)

Può essere usato in caso di adenocarcinoma perché i pazienti con tumore squamoso rispondono peggio dei pazienti con adenocarcinoma e vanno incontro più frequentemente ad emorragie fatali.



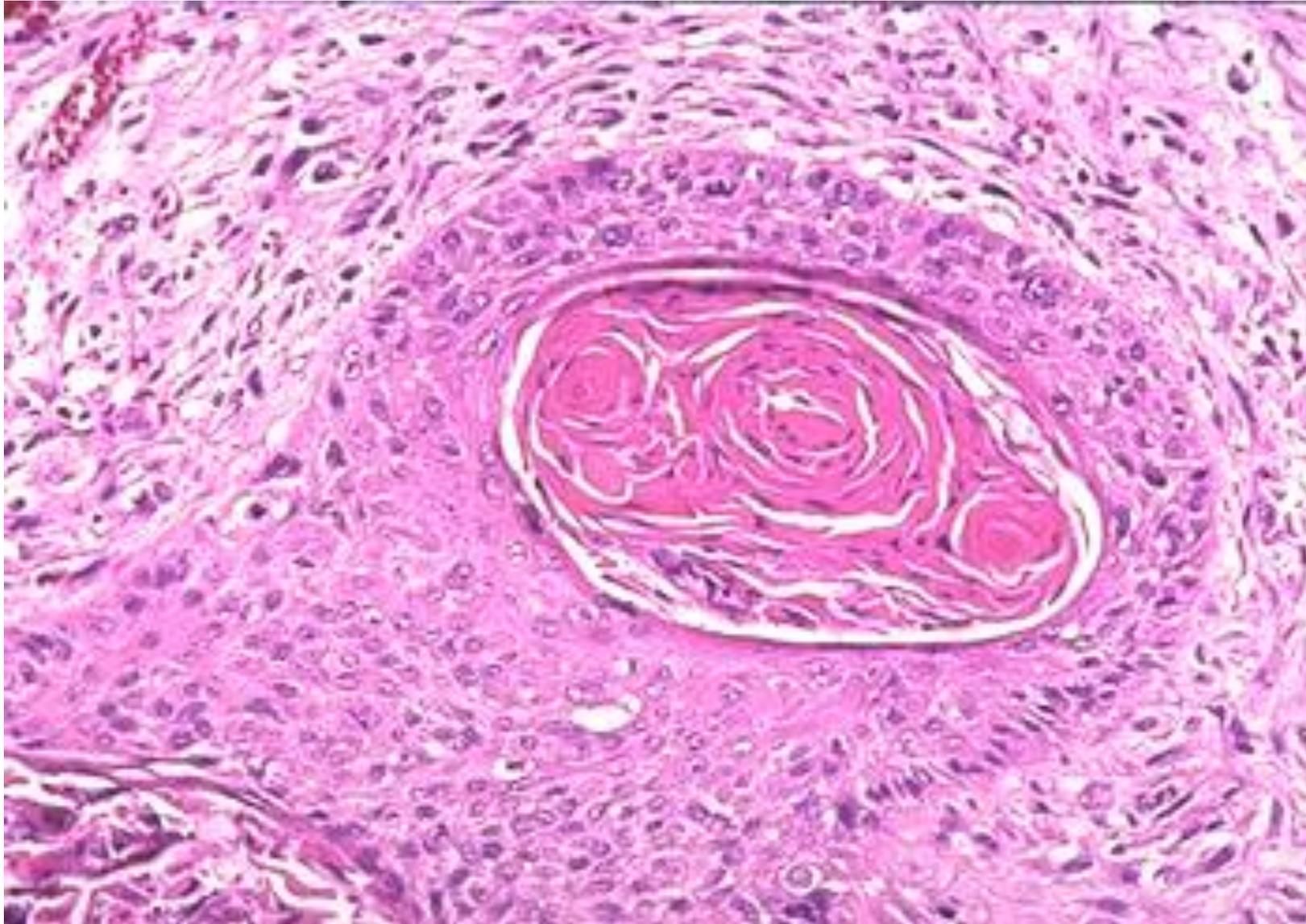
Bronchoscopy



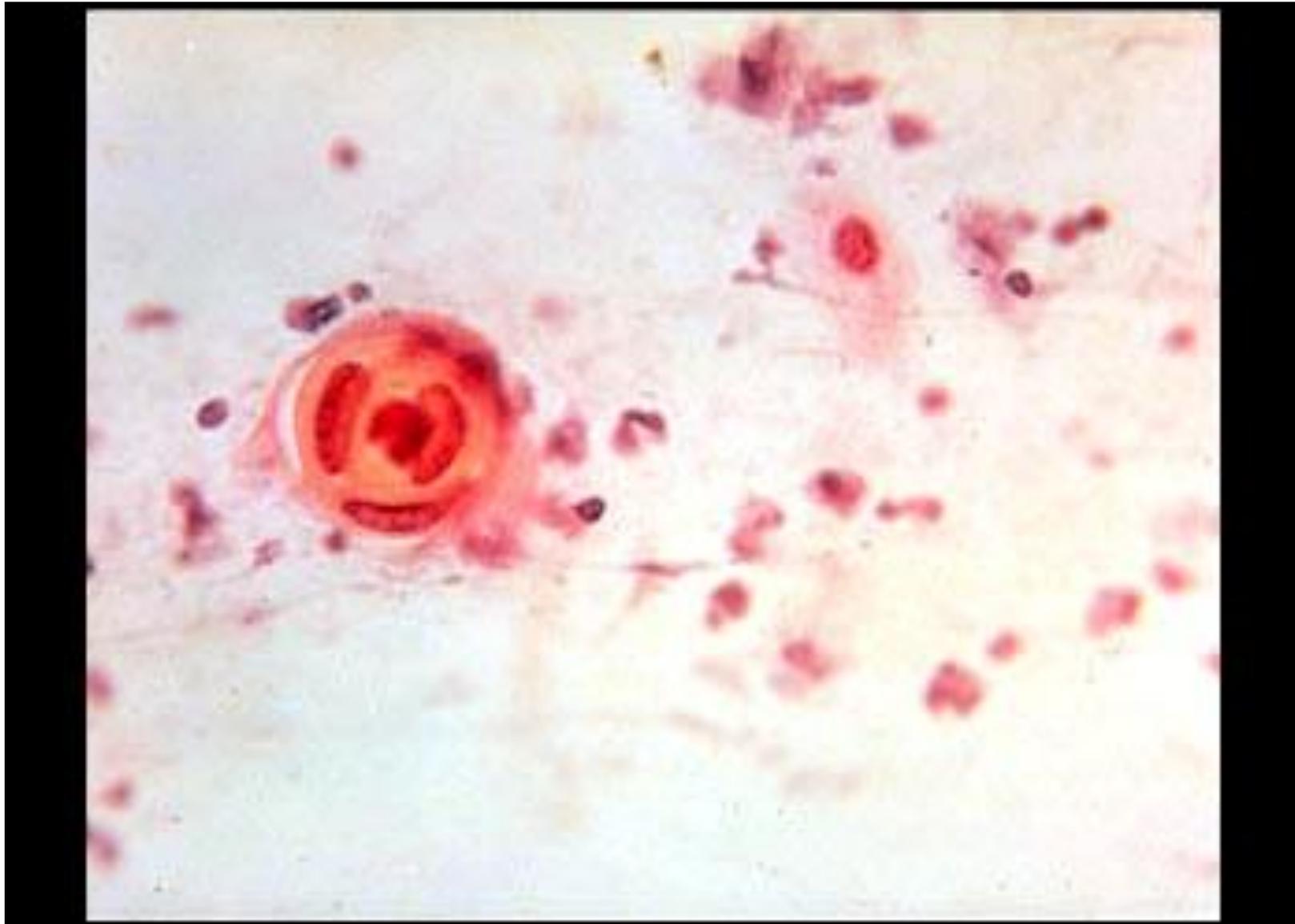


Cavitazione

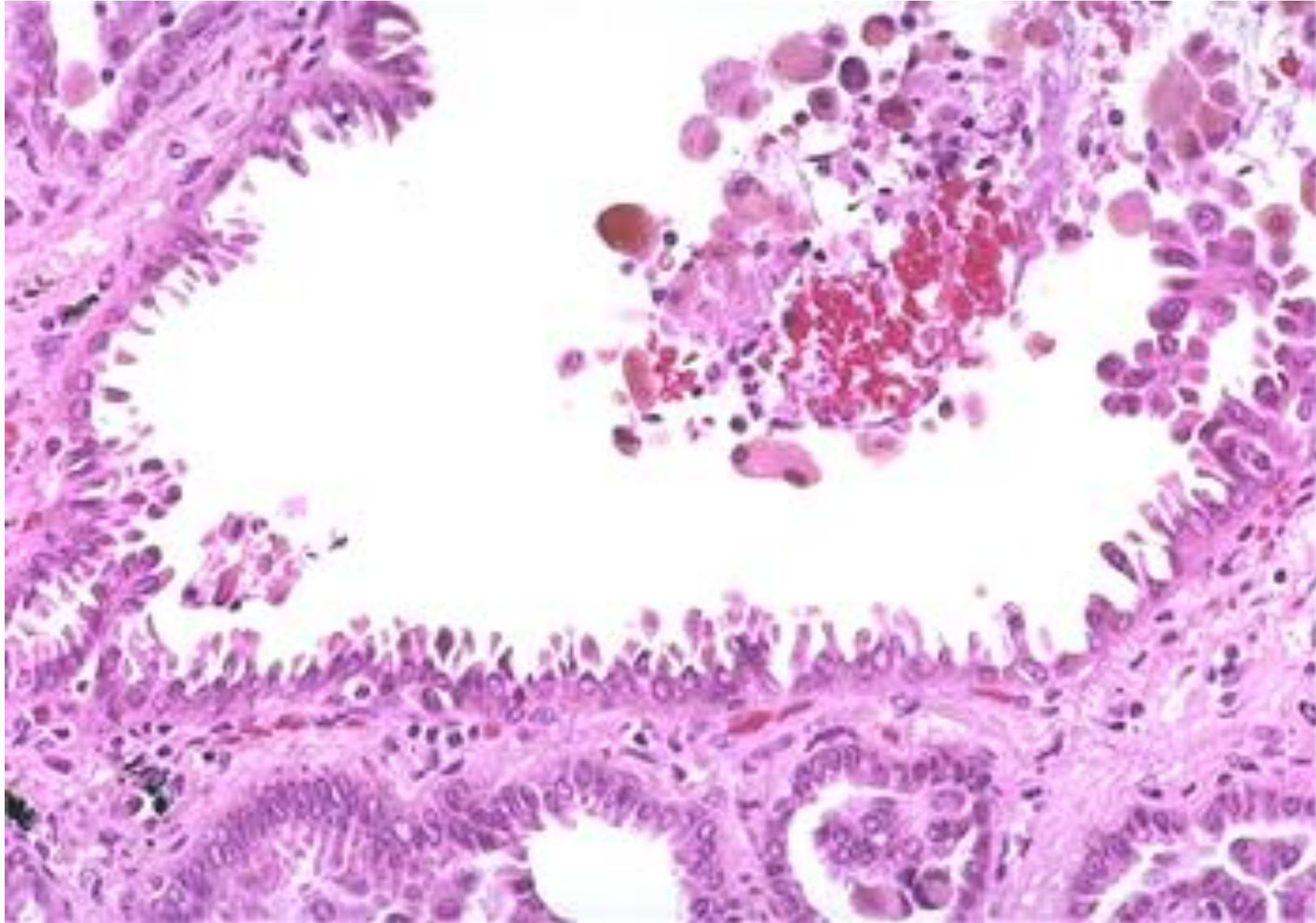
Carcinoma squamoso



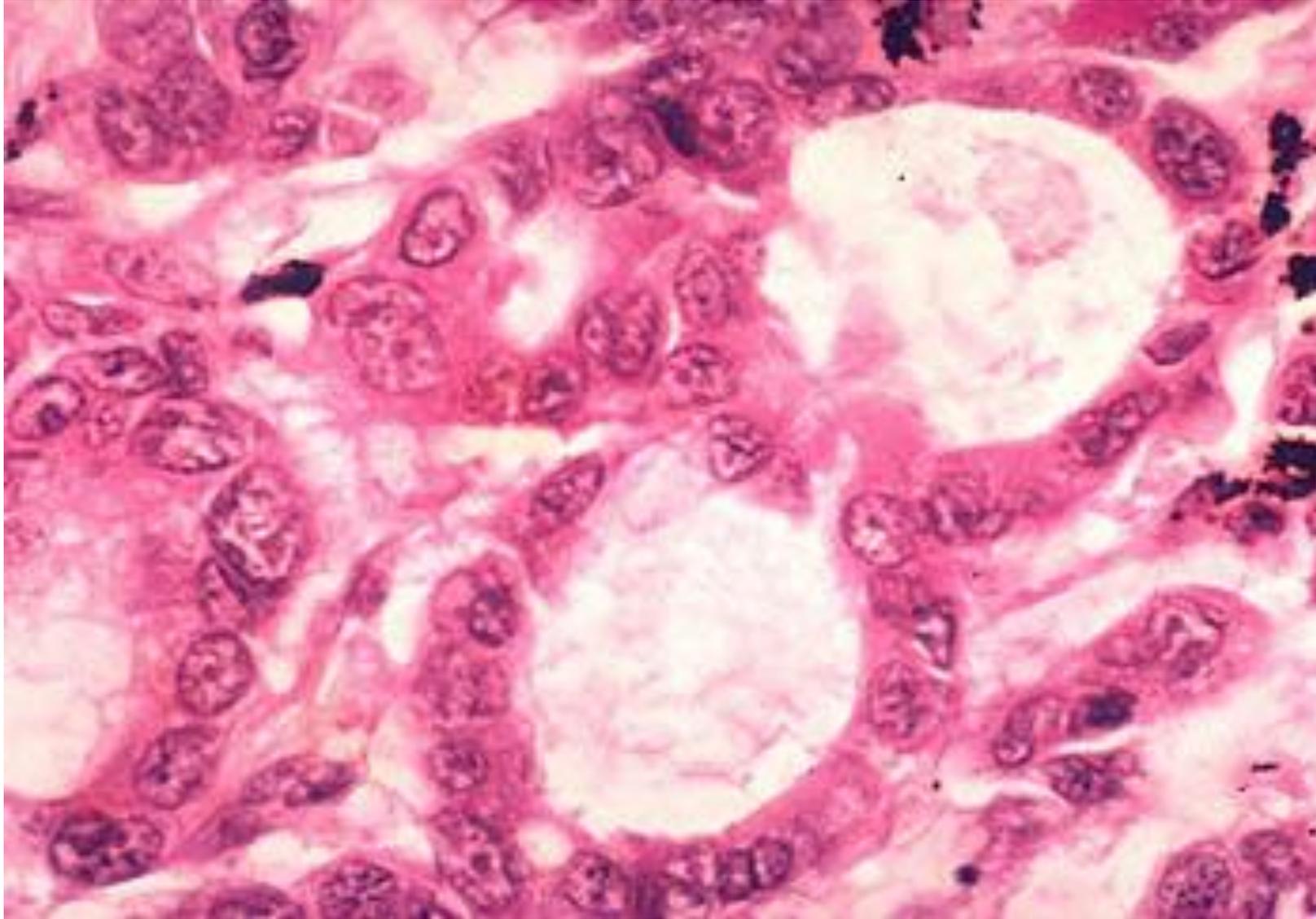
Citologia nel ca squamoso: cellule cheratinizzanti



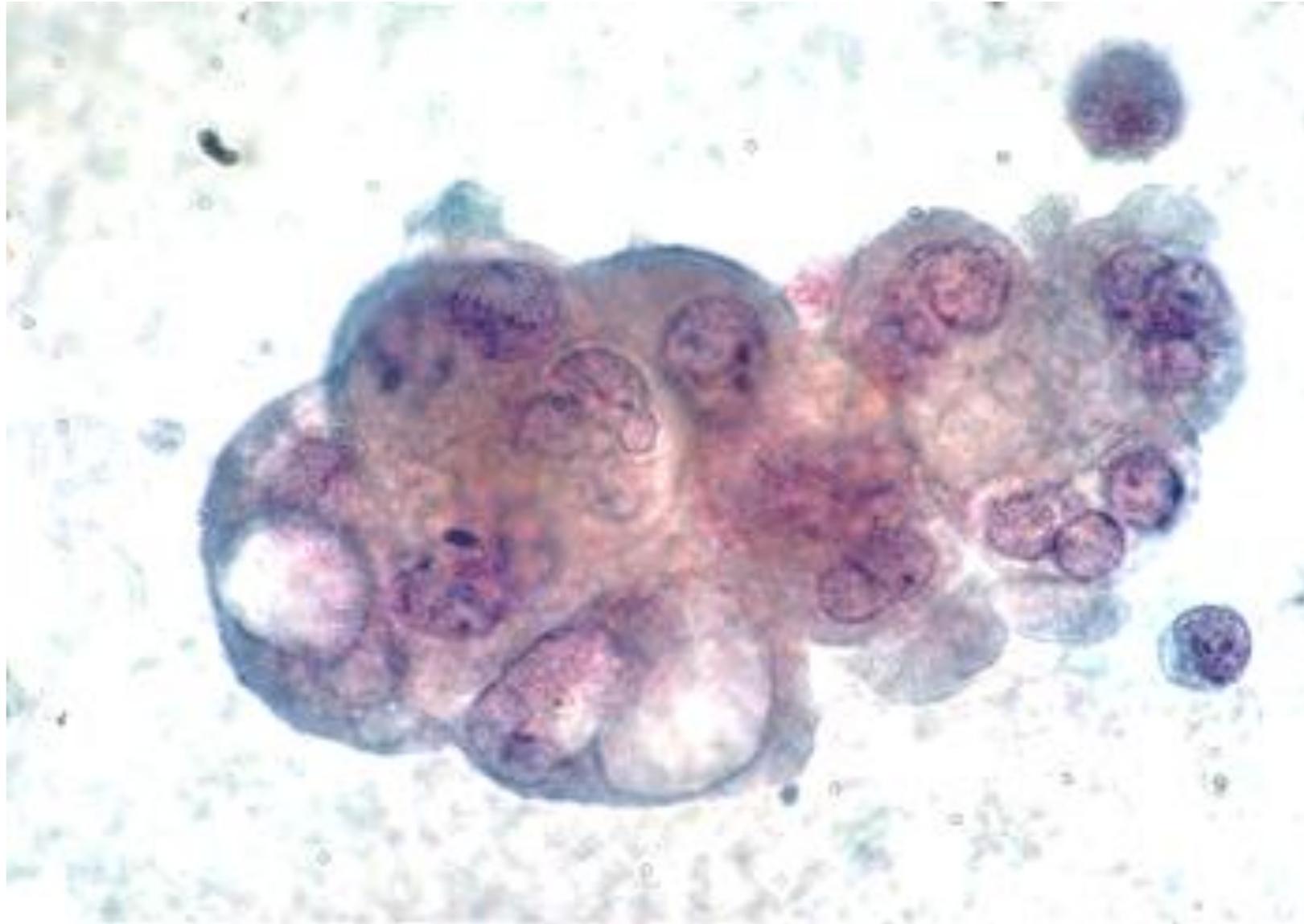
Adenocarcinoma si vedono ghiandole anomale



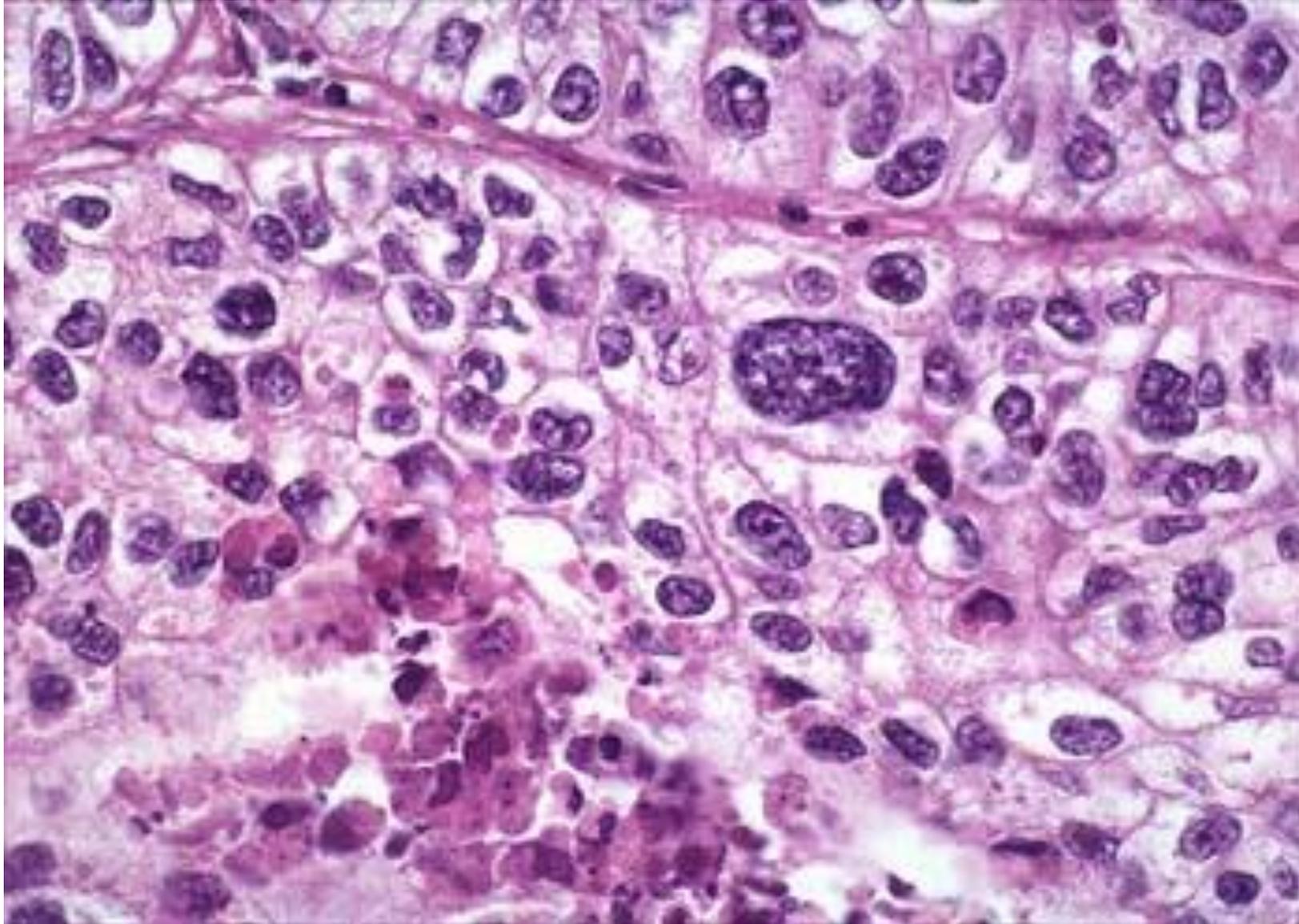
Ghiandole anomale a maggiore ingrandimento

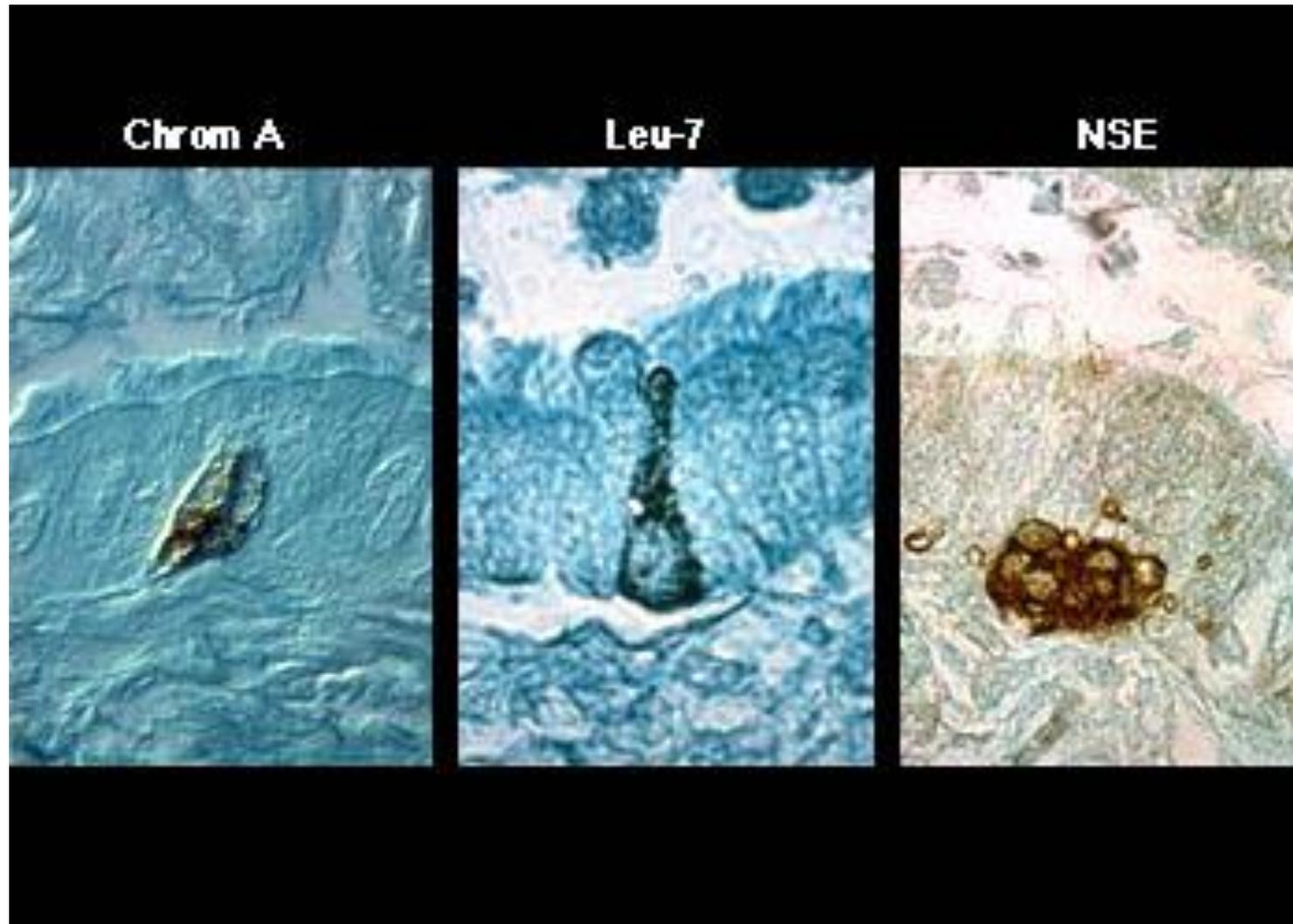


Citologia: adenocarcinoma cellule contenenti muco



TUMORE A GRANDI CELLULE

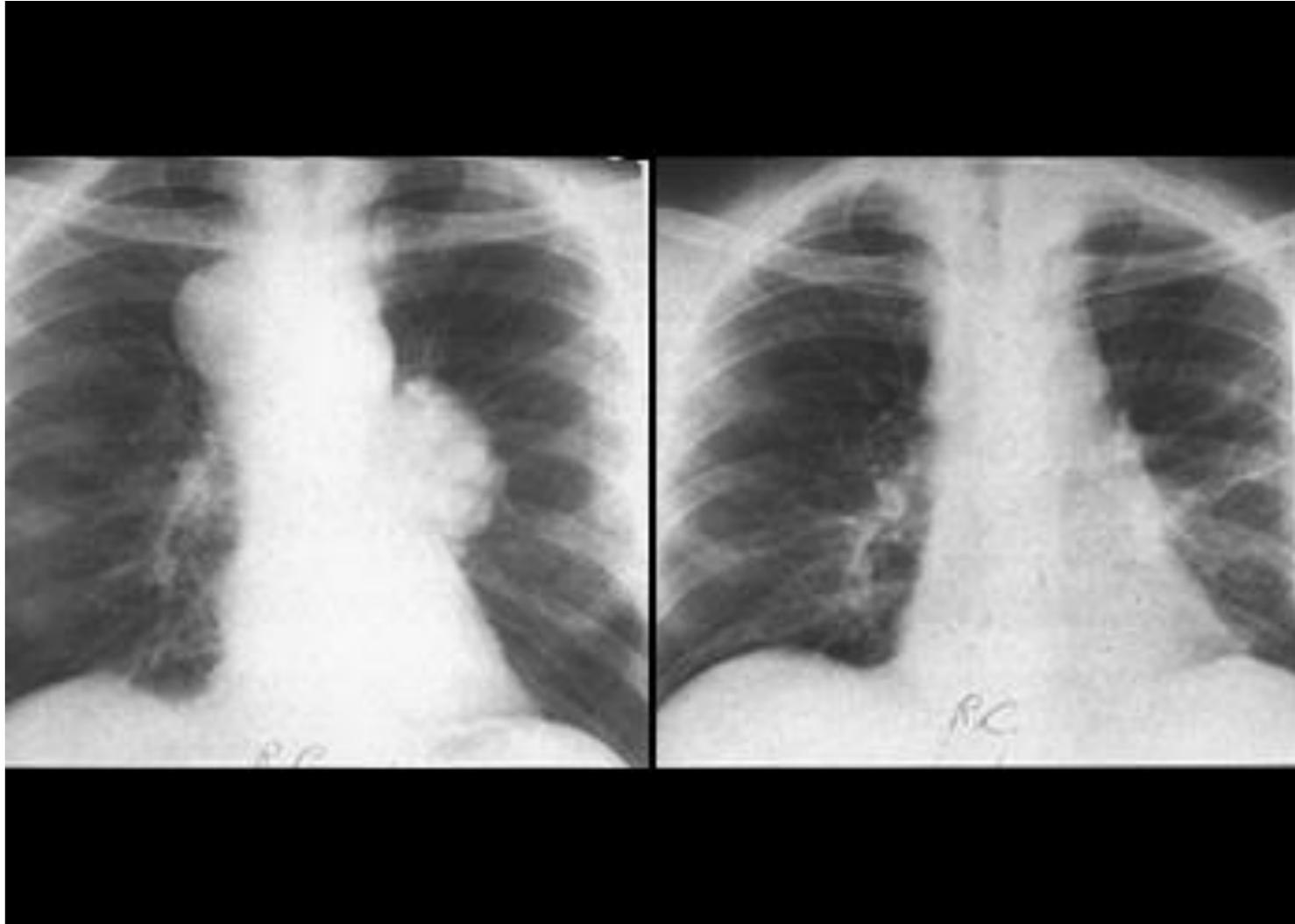




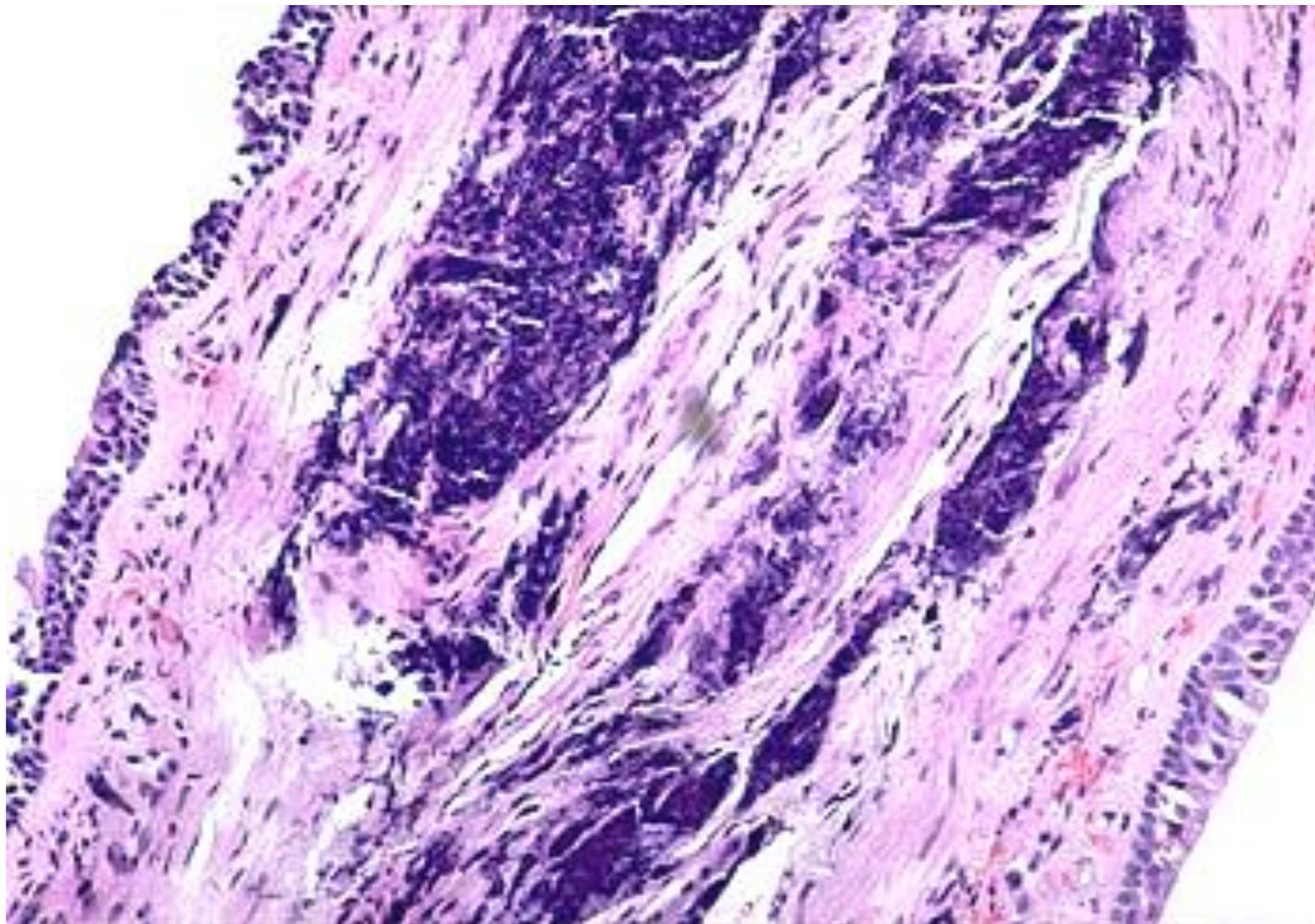
Cellule neuroendocrine nella mucosa normale

Il tumore neuroendocrino a piccole cellule del polmone metastatizza precocemente per via ematica le cellule sono della grandezza dei linfociti

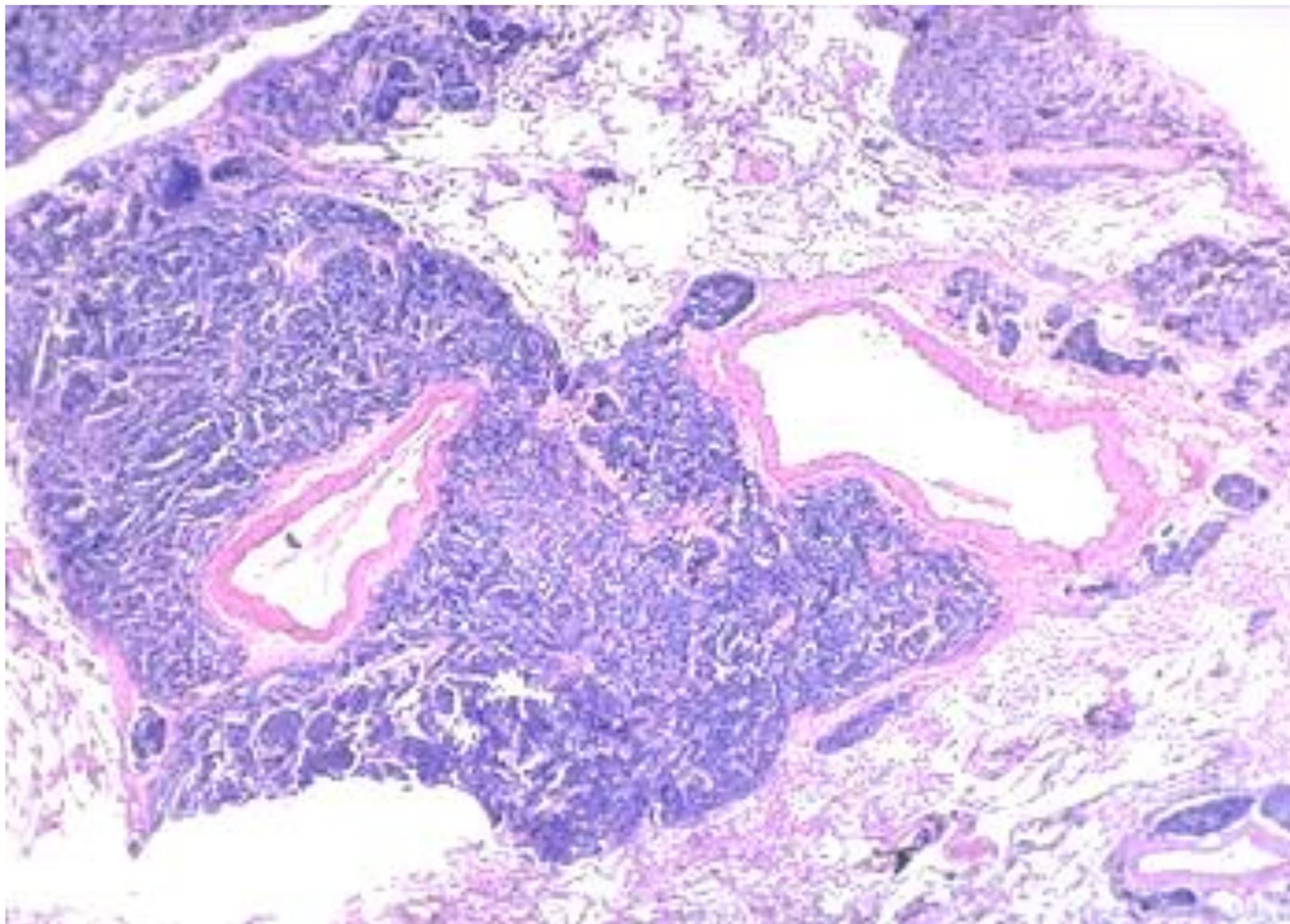
Massa e linfonodi in tumore a piccole cellule o microcitoma



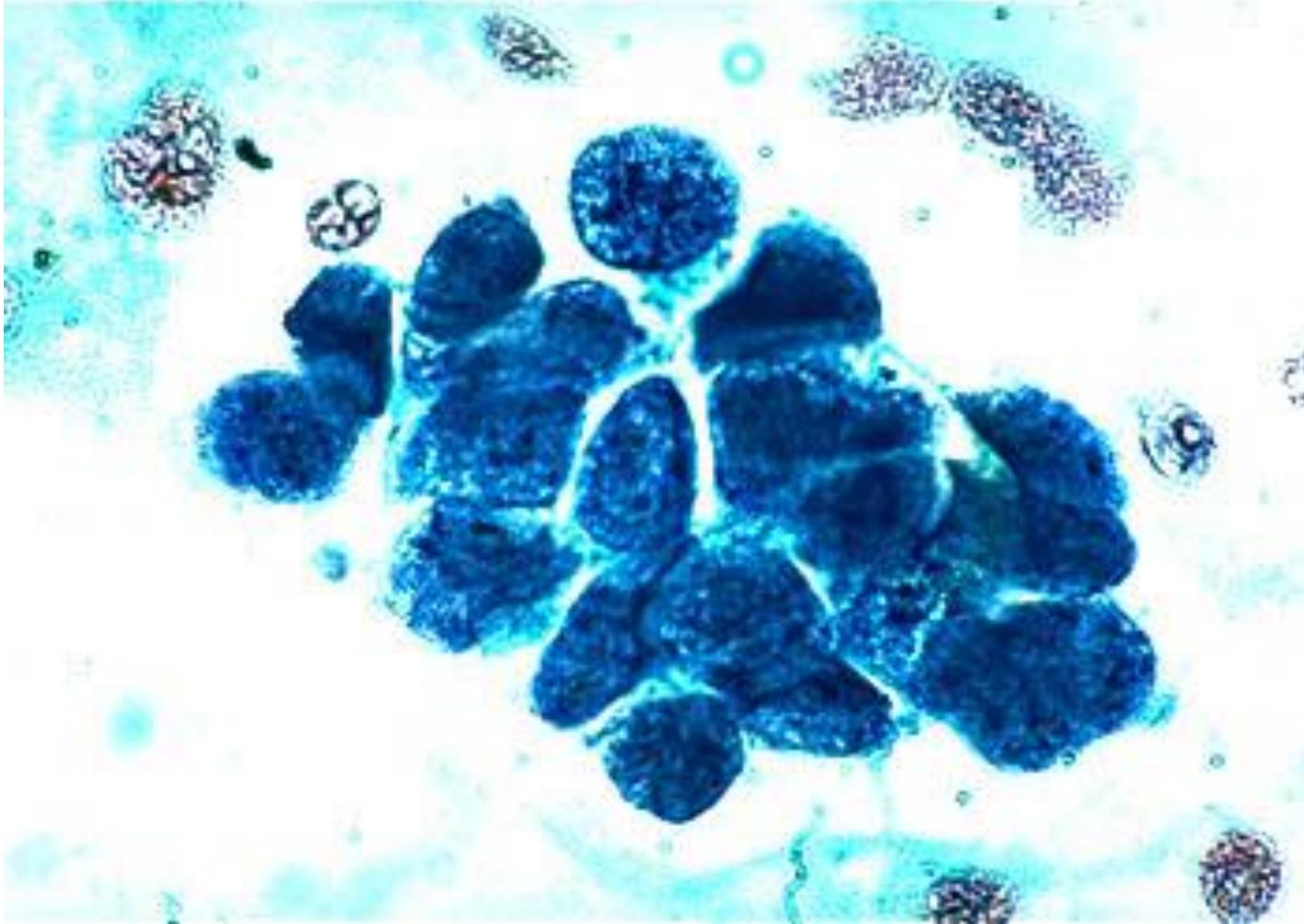
Tumore neuroendocrino a piccole cellule o microcitoma



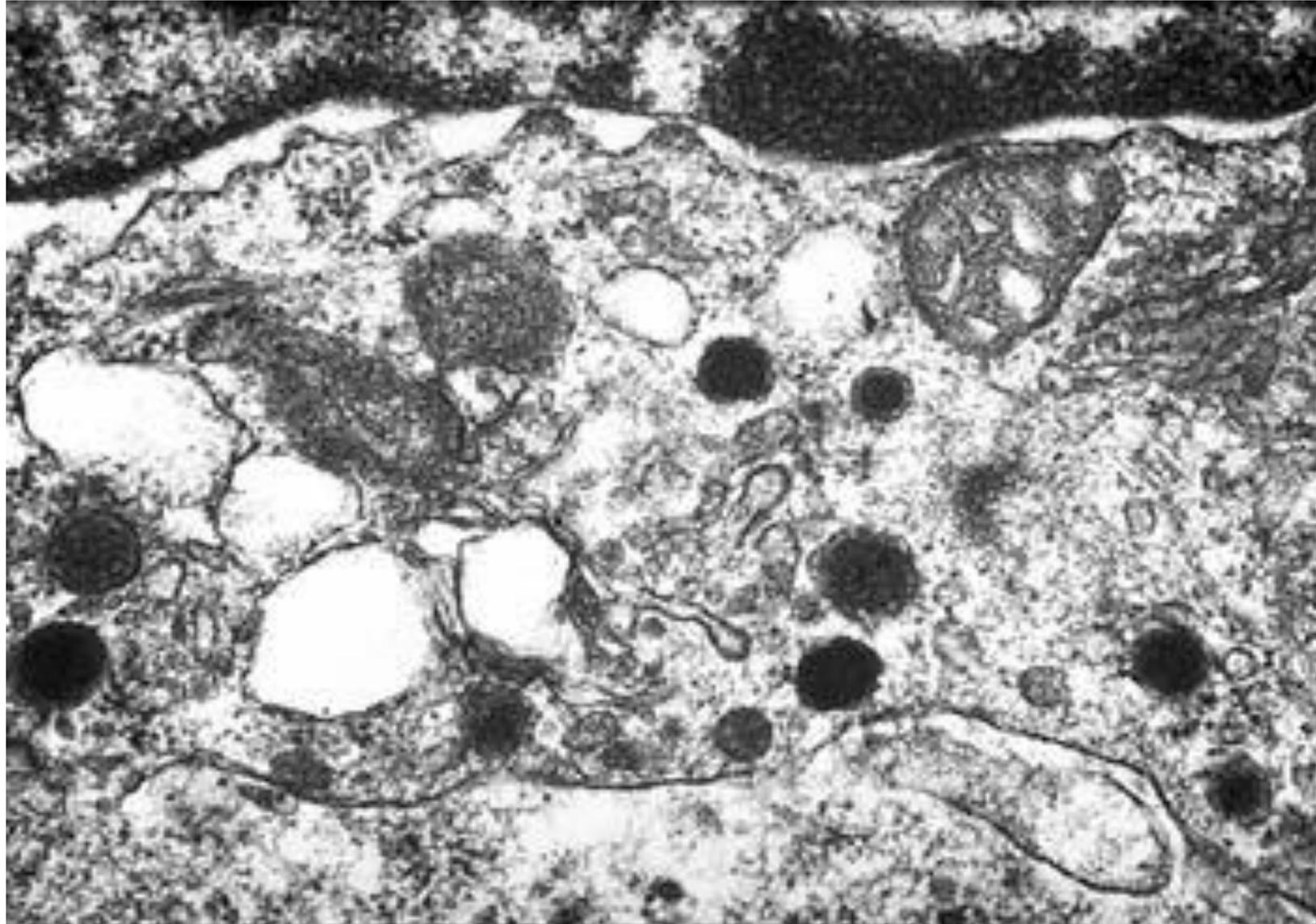
Tumore neuroendocrino a piccole cellule o microcitoma

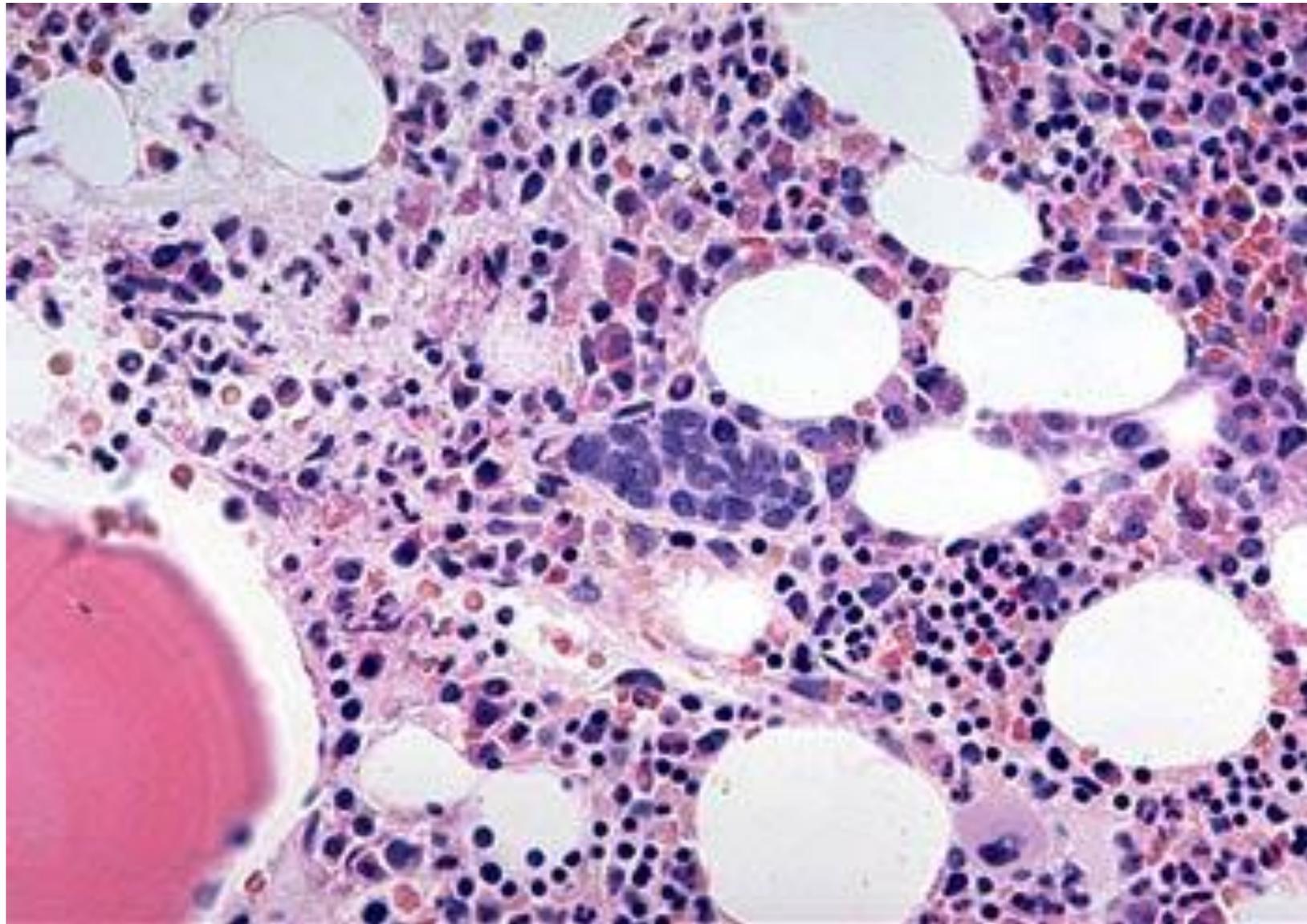


Citologia tumore neuroendocrino a piccole cellule o microcitoma



Microscopia elettronica granuli in tumore neuroendocrino a piccole cellule





Metastasi al midollo osseo di tumore neuroendocrino a piccole cellule o microcitoma

Meningi: metastasi di microcitoma

