

Diagnosi dei tumori



Metodi istologici e citologici

Prelievo del campione mediante

- Striscio citologico
- Ago-aspirato
- Biopsia/escissione
- Microdissezione laser per l'analisi molecolare

Conservazione del campione

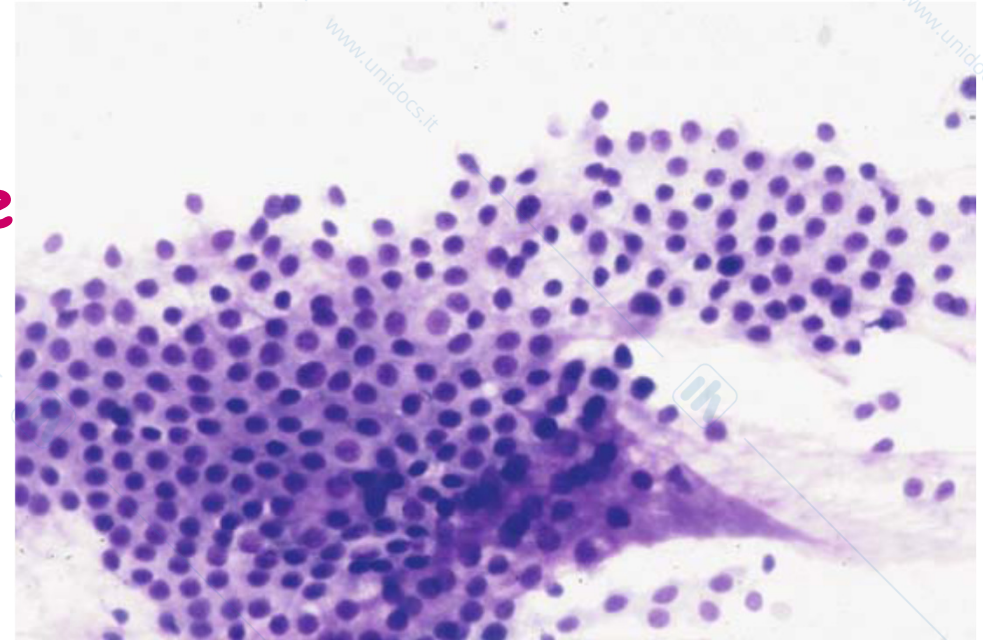
- Soluzione di formalina tamponata pH 6.8 per MO
- Glutaraldeide per ME
- Congelamento (biopsia criostatica) per valutazione ormoni, recettori, ecc

Esame istologico

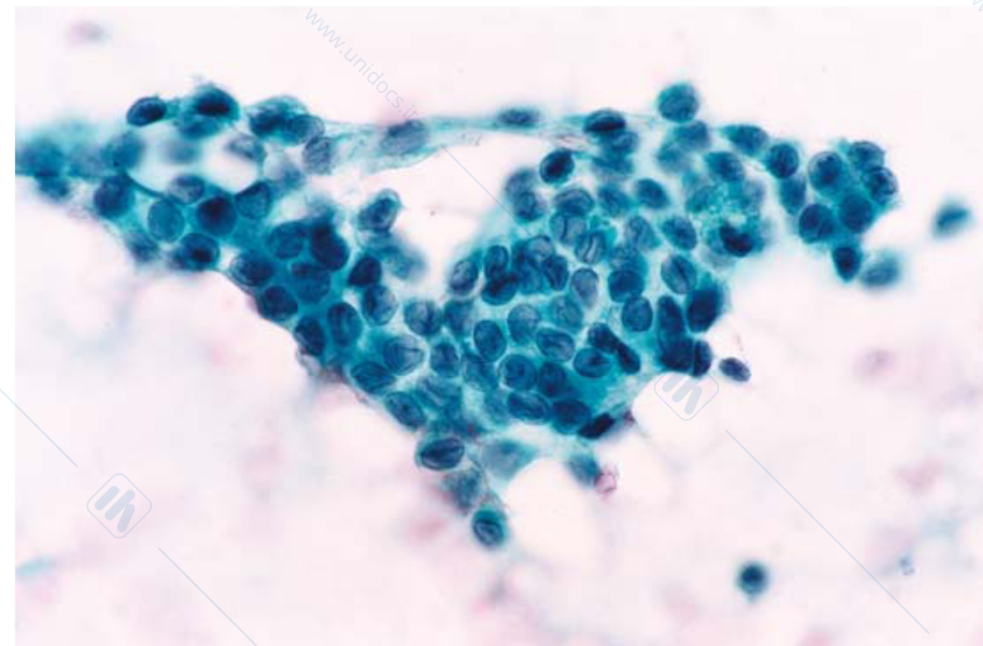
1. Campione conservato in formalina ed incluso in paraffina
2. allestimento di sezioni (5 μm di spessore) mediante microtomo
3. colorazione delle sezioni con ematossilina-eosina
4. osservazione in MO

Esame istologico: definizione dell'origine istogenetica del tumore

Carcinoma follicolare
della tiroide



Carcinoma papillare della
tiroide



Esame istologico: La graduazione (grading)

Identificazione in base all'esame istologico del grado di malignità di un tumore, sulla base di atipie delle cellule tumorali, indici del grado di differenziazione.

La graduazione rappresenta un giudizio **diagnostico**, e anche **prognostico**, di gravità

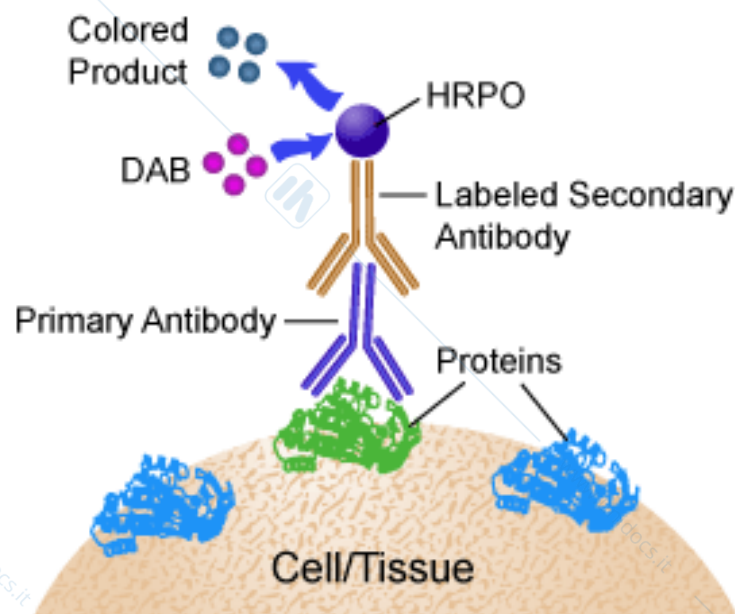
- | | |
|-----------|--|
| Grado I | tumori costituiti da cellule ben differenziate |
| Grado II | tumori costituiti da cellule mediamente differenziate |
| Grado III | tumori costituiti da cellule indifferenziate (anaplastici) |
| Grado IV | tumori costituiti da cellule il cui grado di differenziazione non è definibile |

Immunoistochimica

1. Applicazione di un anticorpo primario (monoclonale o policlonale) diretto contro antigeni tumorali, recettori di membrana, fattori di trascrizione, ecc
2. Applicazione di anticorpi diretti contro l'anticorpo primario coniugati con un enzima (es perossidasi di rafano) o con fluorocromo
3. Applicazione del substrato cromogeno per l'enzima
4. Osservazione in MO o in fluorescenza

Immunocitochimica e immunoistochimica

Indirect Immunohistochemistry



Immunofluorescence

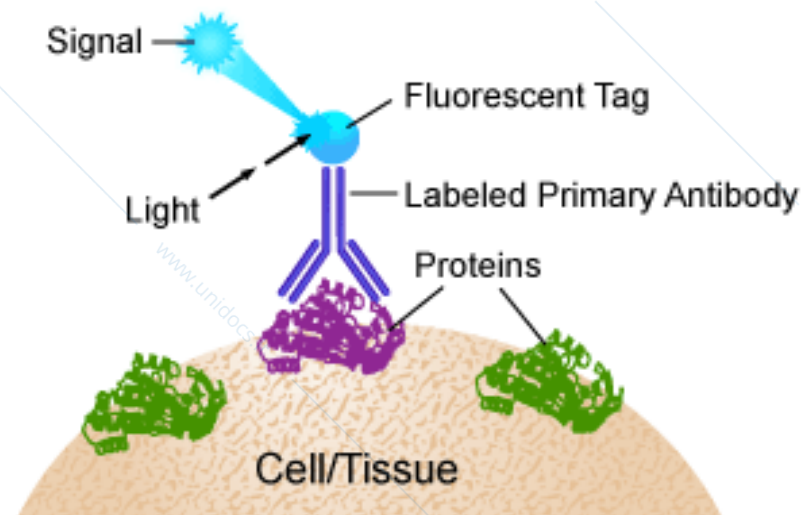


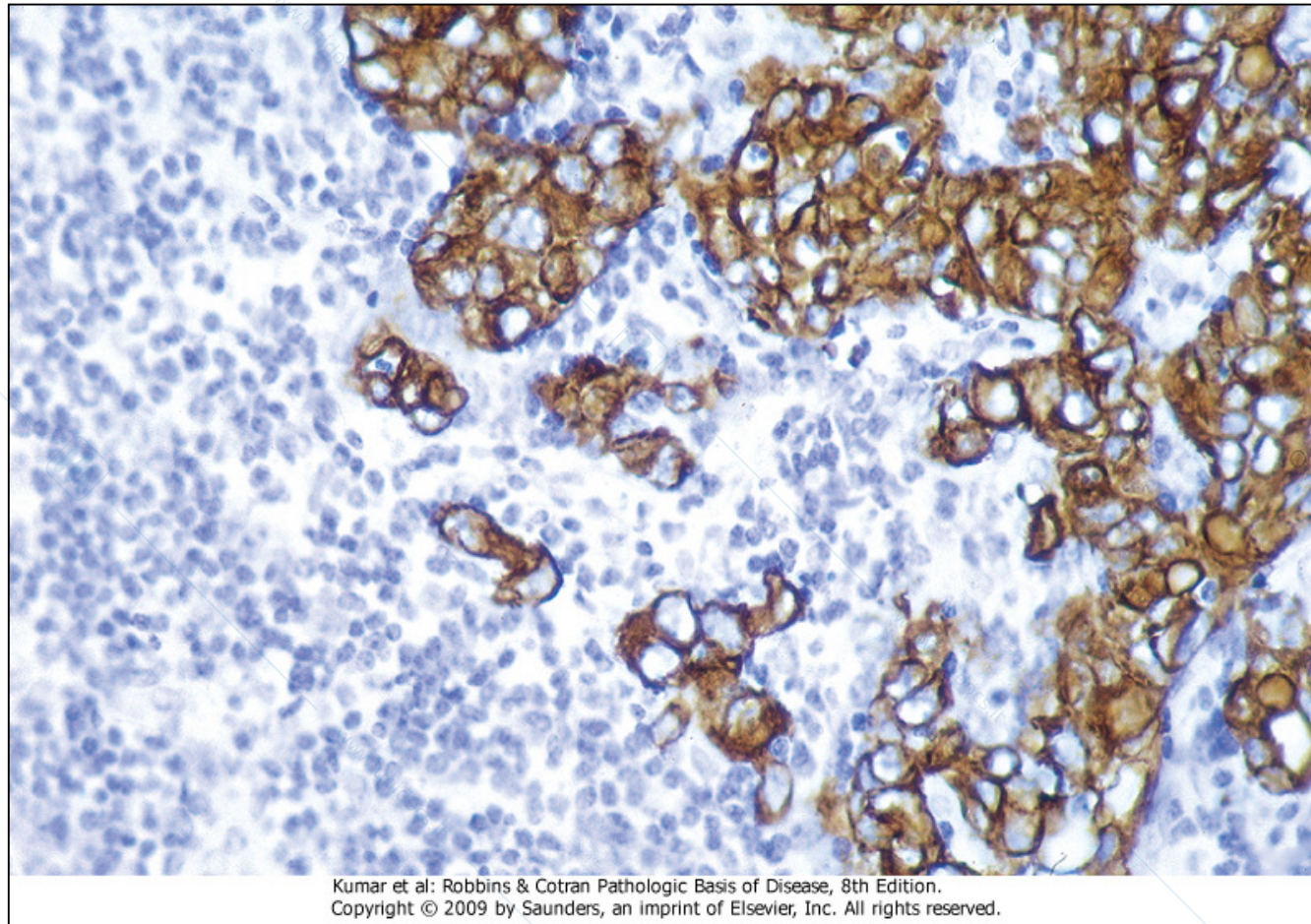
Diagram 1: Illustration of Indirect Immunohistochemistry and Immunofluorescence methods.

Applicazioni della Immunoistochimica

1. Classificazione istogenetica dei tumori maligni anaplastici

Si utilizzano anticorpi diretti contro filamenti intermedi caratteristici di cellule da diversi tessuti. Es.

- citocheratine indicano l'origine epiteliale
- Desmina indica l'origine da cellule muscolari
- Vimentina da cellule mesenchimali



Anti-cytokeratin immunoperoxidase stain of a tumor of epithelial origin (carcinoma). (Courtesy of Dr. Melissa Upton, University of Washington, Seattle, WA.)

Applicazioni della Immunoistochimica

2. Determinazione del sito di origine di tumori metastatici

Nel caso in cui venga individuata una metastasi prima del tumore primitivo, la marcatura per immunoistochimica permette di individuare l'origine della metastasi. Es

- Una marcatura positiva per PSA indica l'origine dalla prostata
- Una marcatura positiva per TG indica provenienza dalla tiroide

Applicazioni della Immunoistochimica

3. Individuazione di molecole con significato prognostico e/o terapeutico

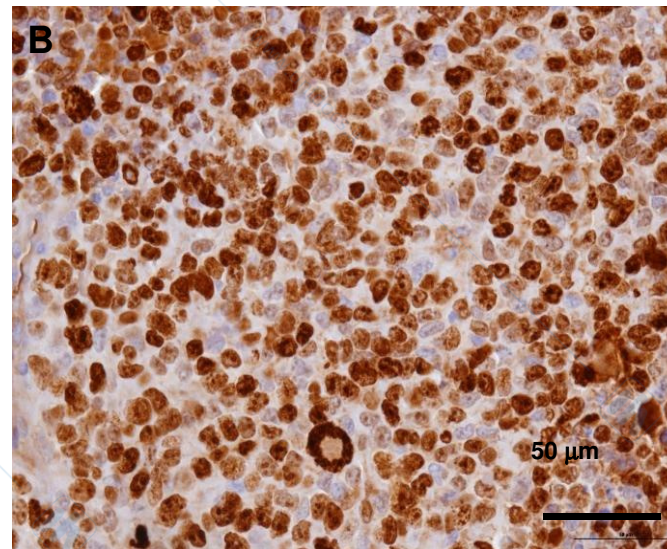
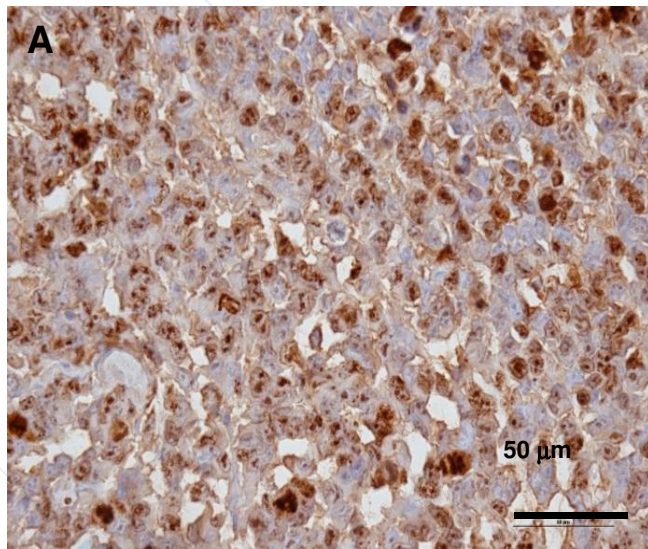
- **Espressione di oncogeni:** es iperespressione della proteina erbB2 nel ca mammario è associata a cattiva prognosi
- L'identificazione di **recettori ormonali** può avere particolare utilità in tumori ormone-dipendenti.

Per es. cellule del ca mammario possono presentare recettori per ormoni (estrogeni/progesterone): i tumori positivi per questi recettori presentano prognosi migliore poiché sensibili alla terapia anti-estrogenica

Applicazioni della Immunoistochimica

3. Individuazione di molecole con significato prognostico e/o terapeutico

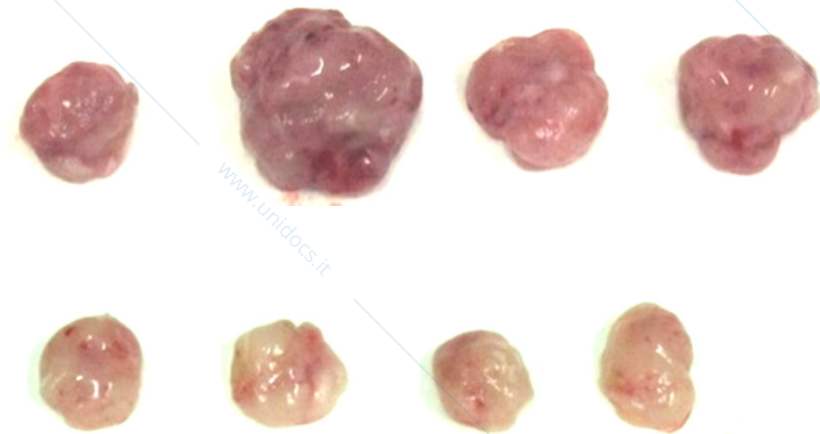
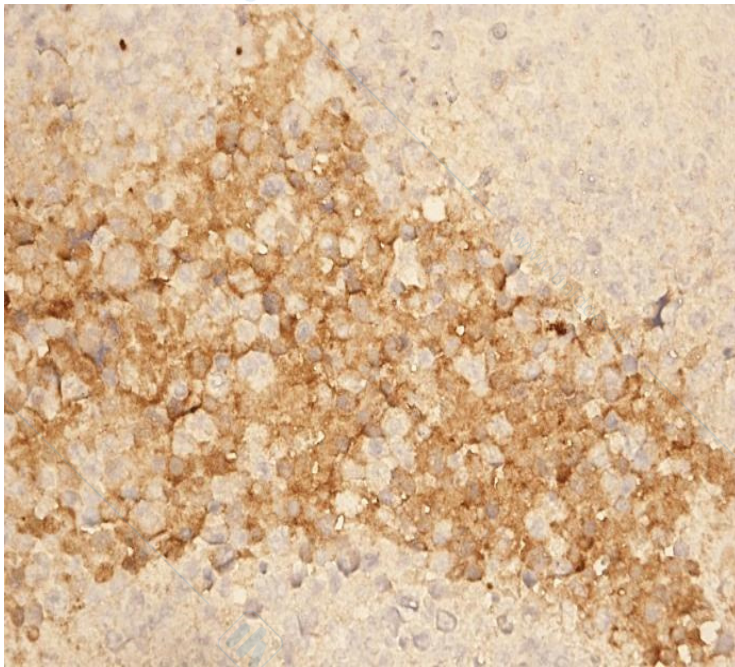
Identificazione della espressione di marcatori di progressione del ciclo cellulare e di proliferazione, es. Ki67



Applicazioni della Immunoistochimica

3. Individuazione di molecole con significato prognostico e/o terapeutico

Espressione di molecole coinvolte nella crescita tumorale (es. VEGF)



Anti-VEGF antibody Avastin (Bevacizumab) reduces tumor growth

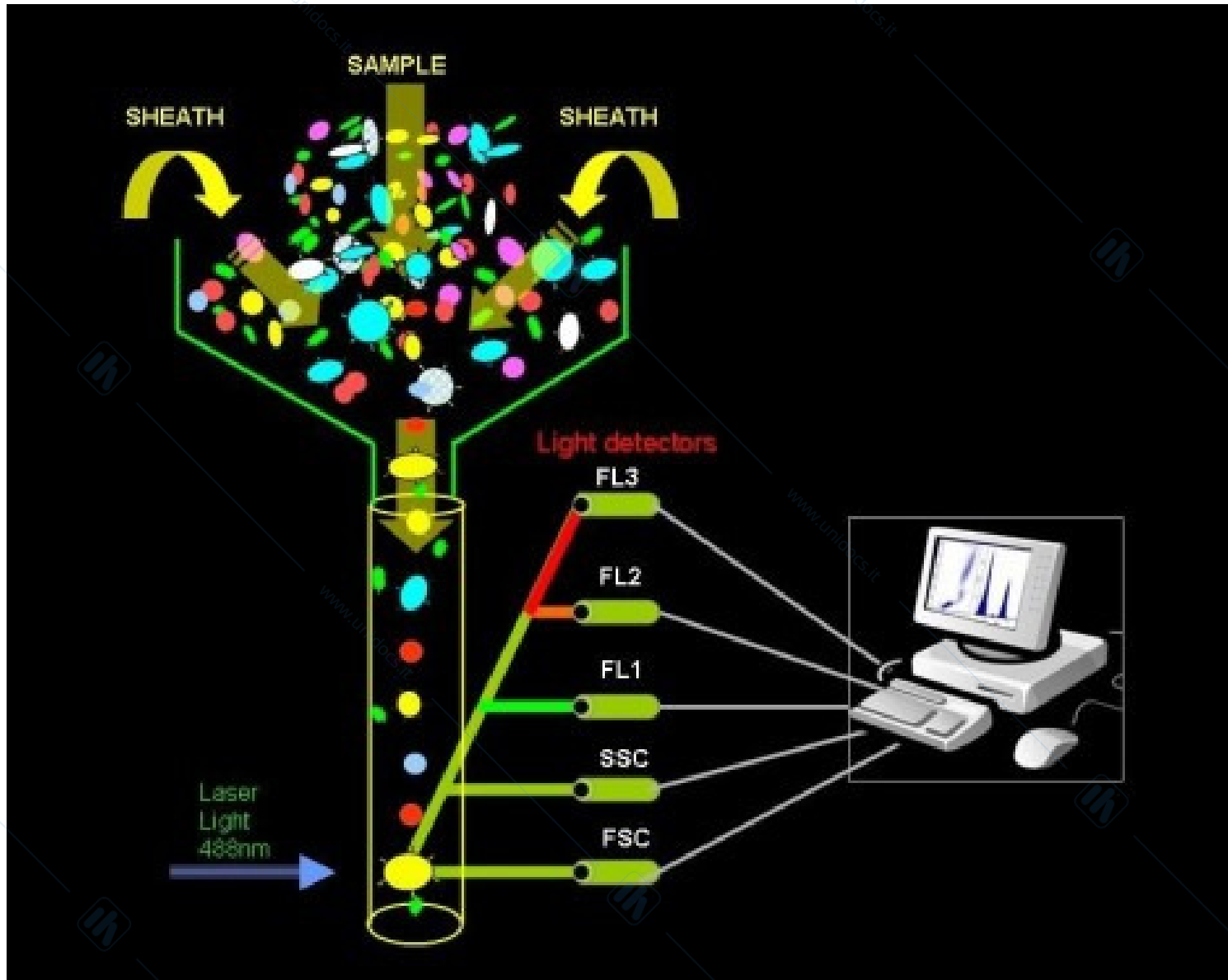
Citometria a flusso

Permette la valutazione quantitativa di

- Antigeni di membrana
- Contenuto cellulare di DNA

È largamente utilizzata nella individuazione di marcatori di superficie per la diagnosi di tumori ematologici (leucemie, linfomi B e T)

Citometria a flusso



Diagnosi molecolare

1. Diagnosi di malignità

- **RT-PCR dell'mRNA per le Ig** permette la distinzione tra proliferazioni benigne (policlonali, reattive) e maligne (monoclonali, neoplastiche) di linfociti B
- **Analisi citogenetiche classiche (cariotipo) o FISH (Fluorescence in situ hybridization)** permettono l'individuazione di **traslocazioni specifiche** di alcune neoplasie
- **Tipizzazione dello spettro cariotipico:** colorazione dei cromosomi a 24 colori con miscela di fluorocromi permette di individuare **piccoli riarrangiamenti cromosomici** non individuabili con le tecniche convenzionali

Diagnosi molecolare

2. Determinazione della malattia minima residua

La presenza di malattia minima residua o di recidiva è individuabile mediante **PCR di sequenze di DNA** con sonde specifiche per i **sottocloni maligni**.

3. Diagnosi della predisposizione ereditaria alla patologia tumorale

Mutazioni dei geni oncosoppressori BRCA1 e BRCA2 o del proto-oncogene RET sono associate a rischio maggiore di sviluppare determinate neoplasie

L'individuazione di queste mutazioni permette l'attuazione di un programma di screening e di consulenza genetica

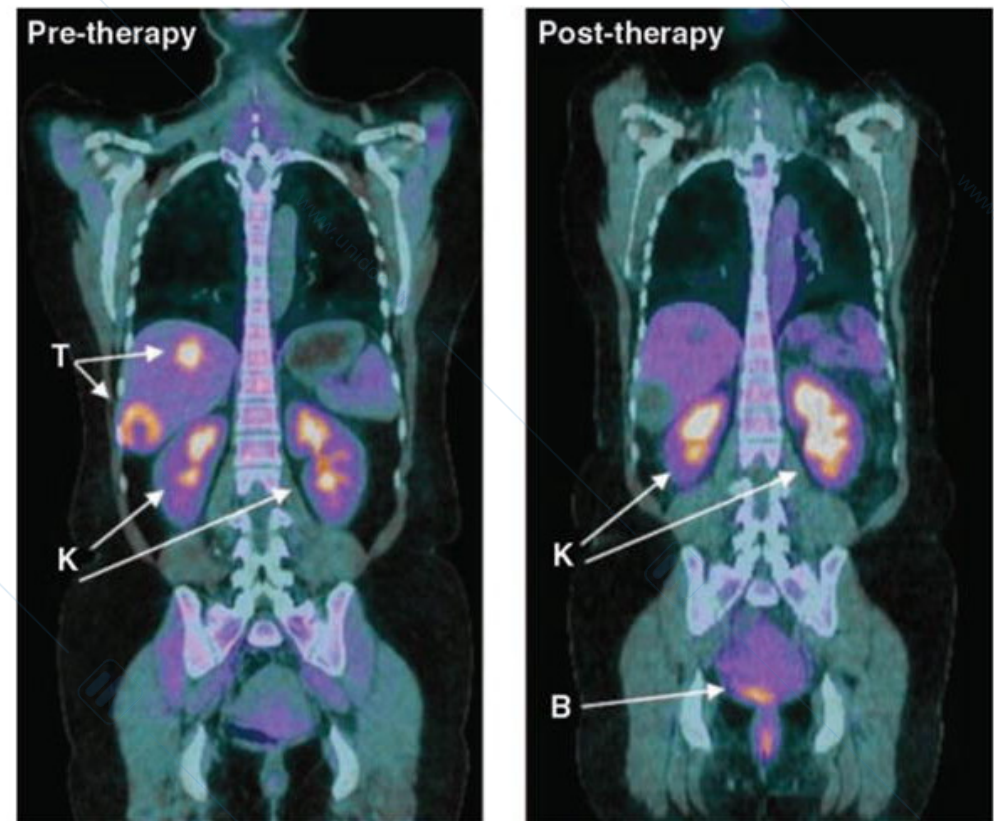
Diagnosi dei tumori con la PET

- Il fenotipo metabolico della cellula neoplastica è la base per l'imaging dei tumori divenuta un importante mezzo per la diagnosi ed il trattamento del cancro
- Viene seguita nel tempo l'assunzione di analoghi del glucosio, in particolare il 2-18F-2-deossiglucosio (FDG) e l'analisi viene eseguita mediante la tomografia ad emissione di positroni (PET).

Immagini di FDG-PET analizzate mediante tomografia computerizzata.

Prima della terapia l'FDG si trova nella tumore (T).

Dopo la terapia l'FDG si trova localizzato nei reni (K) e nella vescica (B) poiché eliminato con le urine.

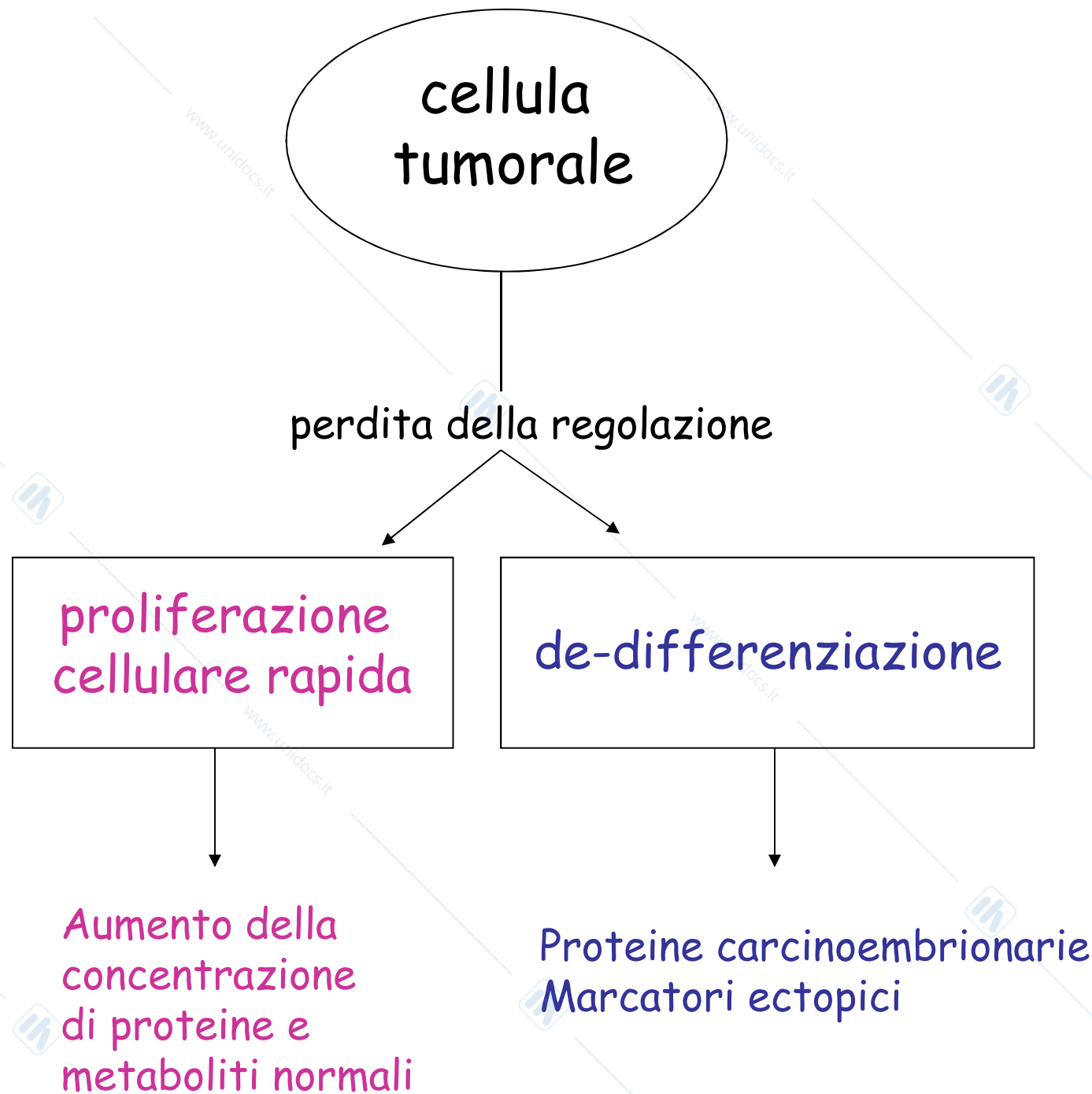


Marcatori tumorali

- Sostanze misurabili nei tessuti o nei liquidi corporei, che possano individuare la presenza di una neoplasia e, possibilmente, l'organo in cui si è sviluppata.
- Si tratta di proteine seriche, enzimi, metaboliti, recettori, rilasciati anche dalle cellule normali, che si ritrovano nel siero in **elevata quantità o prodotti in modo inappropriato** (es. proteine oncofetali)
- per lo più sono antigeni tumore associati (TAA) mentre sono rari i marcatori tumore-specifici (TSA)
- La ricerca di marcatori tumorali nel siero dei pazienti è strumento sia per la **diagnosi dei tumori** che per il **monitoraggio del loro andamento nel tempo**, ad esempio in corso di terapia

Requisiti necessari per l'impiego clinico dei marcatori tumorali

- **Sensibilità:** capacità di individuare **tutti** i pazienti con quel tipo di tumore
- **Specificità:** capacità di individuare **solo** i pazienti con quel tipo di tumore



Marcatori associati a proliferazione cellulare

- ormoni (es. gonadotropina corionica hCG)
 - proteine seriche
 - enzimi e loro metaboliti
-
- utili per il monitoraggio dei pazienti durante il trattamento
 - svantaggio: non consentono di fare diagnosi differenziale tra tumori benigni e maligni

Marcatori associati a differenziazione cellulare

- **Proteine carcinoembrionarie**
 - prodotte da tessuti embrionali, e, nell'adulto, da tumori ed in alcune condizioni infiammatorie
 - la loro concentrazione serica correla con l'attività del tumore e possono essere utili anche nella prognosi
 - **utili per il monitoraggio dei pazienti durante il trattamento e per rilevare recidive**
 - svantaggio: gli anticorpi contro queste proteine talvolta cross-reagiscono con proteine normali

Utilizzo dei marcatori tumorali nella diagnosi

- Considerando che i marcatori tumorali presentano bassa sensibilità e specificità, da soli non bastano per indicare o escludere la presenza di un tumore e, spesso, non sono in grado di distinguere tra tumore benigno e maligno
- Approcci utili per migliorare il loro potere diagnostico:
 - utilizzare marcatori multipli (molto costoso)
 - misurare il loro andamento nel tempo (es. PSA per il carcinoma prostatico)
 - misurarne la densità (es. concentrazione PSA in rapporto al volume prostatico)

Utilizzo dei marcatori tumorali nel follow-up

Sono utilizzati nei seguenti casi:

- se dopo asportazione chirurgica del tumore i livelli serici di marcatori tumorali rimangono alti significa che l'asportazione non è stata completa o che sono presenti metastasi
- durante il trattamento chemioterapico, valutare l'andamento dei marcatori è un'indicazione di efficacia della terapia e può essere utile anche per la scelta del farmaco più adatto ad ogni singolo caso
- Utili indicatori della presenza di recidive quando il loro livello nel sangue si alza nuovamente a distanza di tempo dall'asportazione chirurgica del tumore

Tabella 5-1

Marcatori comunemente impiegati per l'identificazione dei tumori

Marcatore	Cellule bersaglio	Marcatore	Cellule bersaglio
Cellule epiteliali			
Citocheratine	Carcinomi, mesoteliomi	Organo-specifici	
CK7	Molti adenocarcinomi non gastrointestinali	Antigene prostata-specifico (PSA)	Carcinomi della prostata
CK20	Carcinomi ovarici e gastrointestinali, carcinomi uroteliali, tumori di Merkel	Fosfatasi alcalina prostata-specifica (PSAP)	Carcinomi della prostata
Antigene epiteliale di membrana (EMA)	Carcinomi, mesoteliomi, alcuni linfomi a grandi cellule	Tireoglobulina	Tumori della tiroide
Ber-Ep4	La maggior parte dei carcinomi, ma non i mesoteliomi	α -Fetoproteina (AFP)	Carcinomi epatocellulari, tumore del sacco vitellino
B72.3 (tumore-associato)	Molti adenocarcinomi, ma non i mesoteliomi	HepPar 1	Carcinoma epatocellulare
Antigene carcinoembrionario (CEA)	Molti adenocarcinomi di origine endodermica, ma non in altri (ad es. mesotelioma, carcinoma renale)	WT1	Tumore di Wilms, alcuni mesoteliomi
Cellule mesoteliali			
Citocheratine CK5/6	Mesoteliomi	Fosfatasi alcalina placentare (PLAP)	Seminomi, carcinomi embrionali
Vimentina	Mesoteliomi	Gonadotropina corionica umana (hCG)	Tumori dei trofoblasti
HBME	Mesoteliomi, tumori della tiroide	CA19-9	Carcinomi pancreatici e gastrointestinali
Calretinina	Mesoteliomi	CA125	Carcinomi dell'ovaio, dell'endometrio, alcuni tumori non ginecologici (carcinomi del pancreas, mesoteliomi)
Melanociti			
HMB-45	Melanomi	Calcitonina	Carcinomi midollari della tiroide
Proteina S-100	Melanomi, cellule gliali	Marcatori CD	
Mel A	Melanomi	CD1	Alcune leucemie a cellule T, proliferazioni delle cellule di Langerhans
Cellule neuroendocrine e cellule neurali			
Cromogranina, in particolare cromogranina A	Tumori neuroendocrini	CD2	Cellule T, neoplasie delle cellule T
Sinaptofisina	Tumori neuroendocrini	CD3	Cellule T, neoplasie delle cellule T
CD57	Tumori neuroendocrini, cellule T e NK, cellule di Schwann	CD4	Cellule T, neoplasie delle cellule T, monociti, neoplasie dei monociti
Cellule gliali			
Proteine acide fibrillari gliali (GFAP)	Astrocitomi e altri tumori gliali	CD5	Cellule T, alcune neoplasie delle cellule B
Cellule mesenchimali			
Vimentina	La maggior parte dei sarcomi	CD8	Cellule T soppressorie, alcune neoplasie delle cellule T
Desmina	Tutti i tipi di tumori muscolari	CD10 (antigene comune ALL, CALLA)	Leucemia linfoblastica acuta, alcuni linfomi a cellule B, carcinomi renali
Actina muscolo-specifica	Tumori muscolari, tumori dei miofibroblasti	CD15	Cellule di Reed-Sternberg, subset di cellule T, alcune leucemie mieloidi, molti adenocarcinomi, non i mesoteliomi
CD99	Sarcoma di Ewing, tumori neuroectodermici periferici (PNET), leucemie acute mieloidi e linfoidi	CD19	Cellule B, neoplasie delle cellule B
		CD20	Cellule B, neoplasie delle cellule B
		CD30	Linfoma di Hodgkin, linfoma anaplastico a grandi cellule

I marcatori tumorali più comunemente utilizzati ed accreditati

- | | |
|------------------|-----------------------------|
| • Colon-retto | CEA |
| • Prostata | PSA |
| • Testicolo | AFP |
| • Pancreas | CA-19.9 |
| • Ovaio | Ca-125 |
| • Tiroide | Calcitonina |
| • Neuroendocrino | insulina/glucagone/gastrina |

Antigene carcinoembrionario (CEA)

- Il marcatore più utilizzato per i tumori intestinali
- Prodotto normalmente nel tessuto embrionale di intestino, pancreas e fegato,
- Risulta aumentato nei seguenti carcinomi: **60-90% colon-retto**, **50-80% pancreas** e **25-50% stomaco e mammella**.
- **Aumenta inoltre in patologie infiammatorie non tumorali:** colite ulcerosa, malattia di Chron, cirrosi epatica, epatite.
- Il dosaggio del CEA manca di specificità necessaria per diagnosticare precocemente la presenza di neoplasie.
- **Più utile nel follow-up**

Antigene prostatico specifico (PSA)

- Non discrimina sempre le formazioni maligne da quelle benigne.
- Un suo incremento può verificarsi anche in condizioni infiammatorie
- deve essere verificato il suo andamento nel tempo
- è utilissimo per rivelare metastasi o recidive dopo asportazione chirurgica del tumore

PSA < 4 ng/ml	Soggetti normali
PSA 4 - 10 ng/ml	Ipertrofia prostatica
PSA > 10 ng/ml	Tumore prostata

Alfa-fetoproteina (AFP)

- In condizioni normali è prodotta nel sacco vitellino e dagli epatociti fetali e in misura minore dalle cellule renali e del tratto gastrointestinale fetali
- **Aumento di AFP può essere rilevata in pz con tumori delle cellule germinali derivate dal sacco vitellino o con epatocarcinoma**
- Può essere aumentata anche durante la gravidanza o a seguito di **patologie non tumorali del fegato** (epatopatie tossiche, epatiti, cirrosi epatica)

Mucine ed altre glicoproteine

- **CA19-9, CA 50, CA 19-5:** carcinomi del colon, del pancreas ed epatocellulari
- **CA 125: carcinoma ovarico**
a seguito di chemioterapia si può avere una riduzione di questo marcatore
- **CA 15-3: tumore della mammella,** è presente anche in altri adenocarcinomi: colon, polmone, ovaio e pancreas
può essere elevato anche nell'epatite cronica, nella cirrosi epatica, nella sarcoidosi, tubercolosi e nel lupus eritematoso sistemico

Calcitonina

- Ormone peptidico circolante elevato nel **ca midollare della tiroide**.
- **Secrezione ectopica** anche nei **carcinomi broncogeni**
- Può aumentare anche in pz con maggior turnover del tessuto osseo associato a metastasi ossee.

PTH-rP

- Diagnosi differenziale di ipercalcemia associata a tumore quale **sindrome paraneoplastica**, rispetto a quella dovuta a iperparatiroidismo