

# Ematopoiesi e Laboratorio di base

---

DR.SSA SIMONA BERNARDI

SIMONA.BERNARDI@UNIBS.IT

# hSC

---

Compartimento di sottopopolazioni cellulari con diverse caratteristiche biologiche e capacità proliferativa

Long-term hSC è la capostipite, seguita dalla short-term hSC che ricostruisce l'ematopoiesi a breve termine post trapianto di midollo osseo. Entrambe hanno capacità di self-renewal.

La maggior parte delle hSC entra in ciclo una volta al mese

Negli stadi successivi la capacità di rinnovamento e il potenziale differenziativo si riducono.

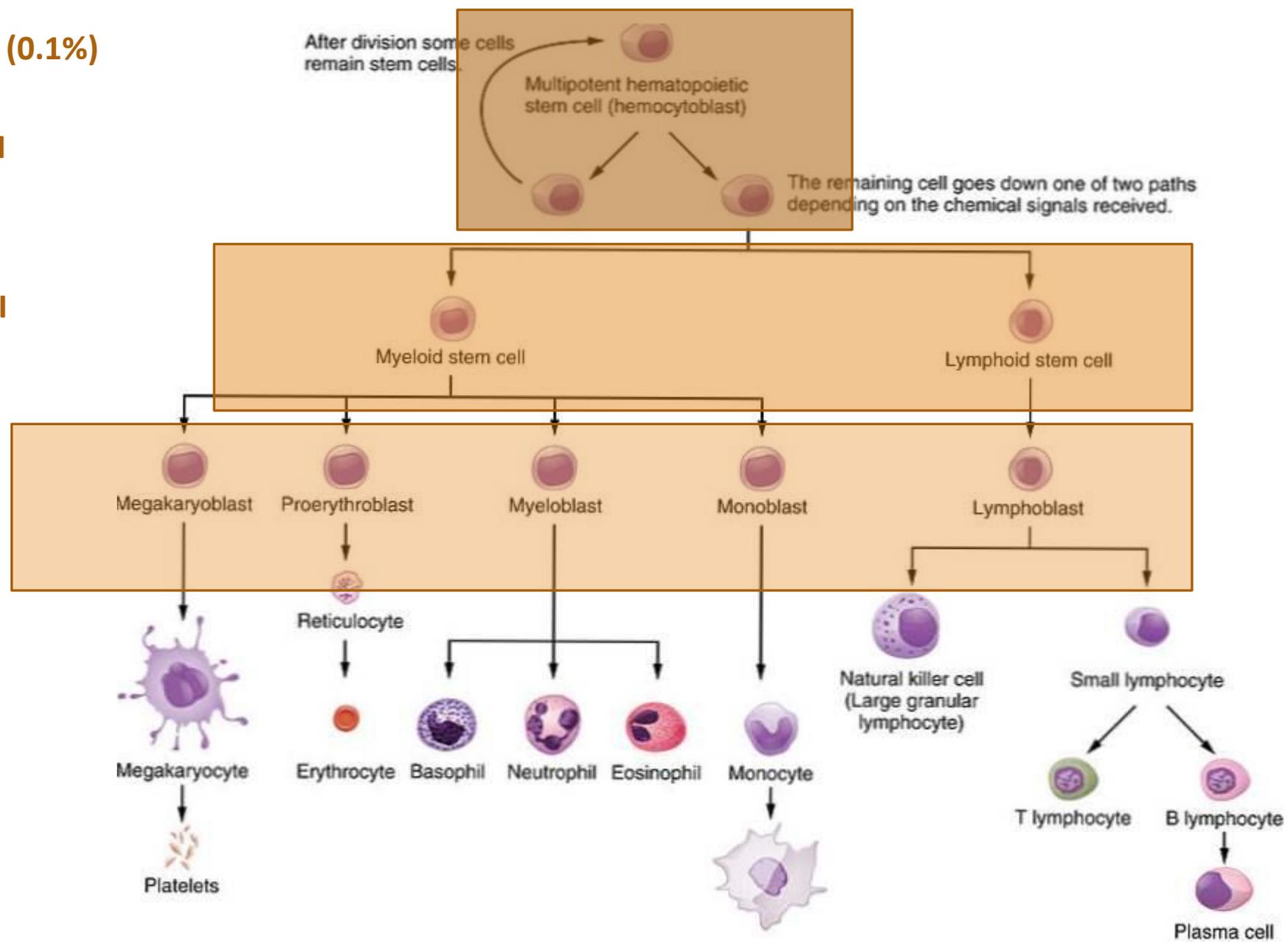
MULTIPOTENTI → OLIGOPOTENTI → UNIPOTENTI

**PLURIPOTENTI (0.1%)**

**MULTIPOTENTI**

**OLIGOPOTENTI**

**UNIPOTENTI**



# Progenitori ematopoietici

---

Progenitori multipotenti: staminali con un commitment multilineage irreversibile

1° differenziamento: linea mieloide (CMP) vs linea linfoide (CLP)

2° differenziamento: CMP si distingue in lineage granulocitio-macrofagico vs eritroide-megacariocitario

3° differenziamento: CLP si distingue in pre-B e pre-T e nei precursori delle NK; mentre le due linee derivate da CMP si distinguono in granulocitaria, macrofagica, eritroide, megacariocitaria e dendritica. Questa può essere anche di derivazione linfoide.

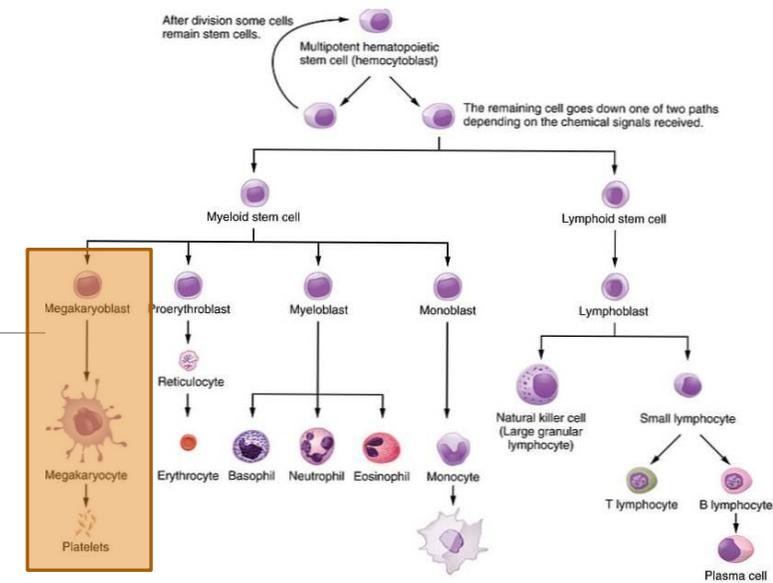
TIPOLOGIA CELLULARE	EMIVITA FISIOLÓGICA
ERITROCITI	120 d
GRANULOCITI	6 - 8 h
MONOCITI	8 h
PIASTRINE	4 - 5 d
LINFOCITI	VARIABLE

# Megacariocitopoiesi

Produzione di megacariociti e, dalla loro frammentazione, di piastrine. Progenitore comune con la linea eritroide. In questo caso il principale regolatore è Kit, trombopoietina e IL-3.

Prevede:

- Aumento del numero di lobi del nucleo e del volume e comparsa di granulazioni (megacarioblasto)
- Il citoplasma acquisisce microfilamenti e invaginazioni mentre i granuli si arricchiscono di fibrinogeno, PDGF e proteine piastrino-specifiche (megacariocito. Circa 25% delle cellule di questa linea nel midollo)
- Formazione di pseudopodi e progressiva demarcazione delle piastrine (megacariocito maturo). La lisi del citoplasma genera circa 1000-5000 piastrine. Il megacariocito viene poi fagocitato dai macrofagi.



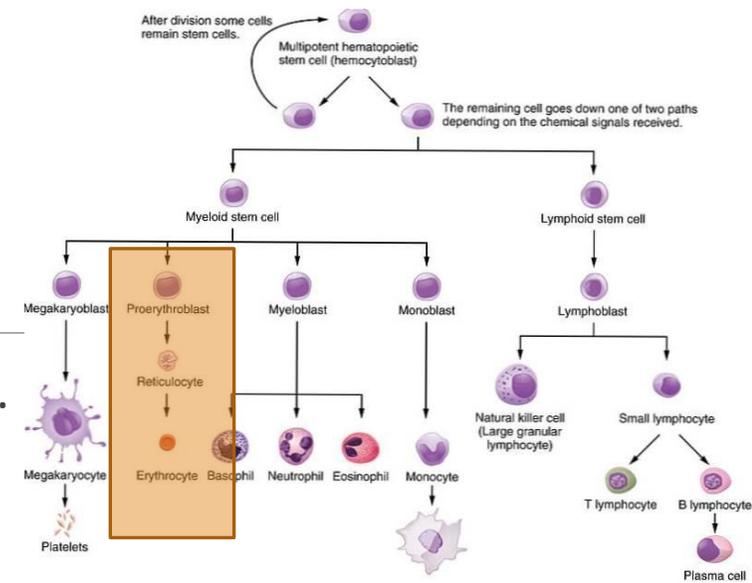
# Eritropoiesi

Produzione giornaliera di  $2,5 \times 10^{11}$  eritrociti (o globuli rossi o emazie).

Il principale regolatore è Epo.

Prevede:

- Riduzione del volume cellulare (proeritroblasto)
- Scomparsa dei nucleoli (eritoblasto basofilo) e compattazione della cromatina (eritroblasto policromatofilo)
- Riduzione dei poliribosomi e dei mitocondri e accumulo di emoglobina nel citoplasma (eritroblasto ortocromatico)
- Espulsione del nucleo (reticolocito). Circa 0,5-1,5% nel sangue periferico e contengono ancora dei poliribosomi per completare la sintesi di emoglobina



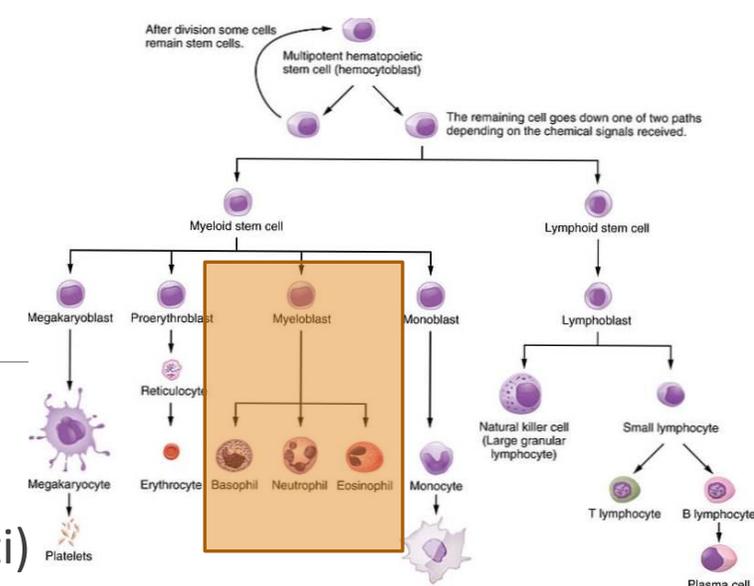
# Granulocitopoiesi

Produzione di granulociti neutrofili, basofili e eosinofili, cioè mediatori dell'immunità innata che hanno attività ameboide (penetrano nei tessuti)

I precursori proliferano nei primi stadi (mieloblasto e promielocito) e poi differenziano solamente.

Prevede:

- Riduzione del volume cellulare con scomparsa dei nucleoli, riduzione del nucleo e compattazione cromatinica
- Segmentazione del nucleo
- Riduzione della basofilia del citoplasma e comparsa di granuli primari (promielocito)
- Formazione di granulazioni secondarie o specifiche neutrofile, eosinofile o basofile (mielocito e metamielocito)



# Monocitopoiesi

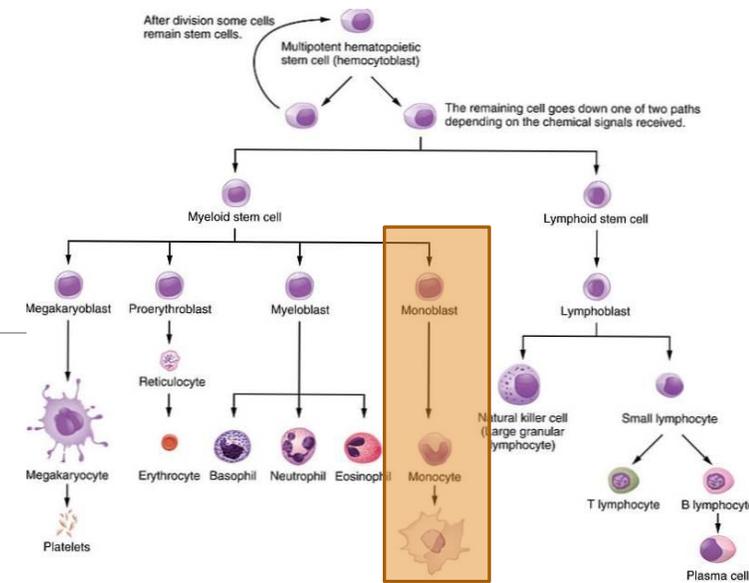
Produzione di monociti circolanti che poi differenzieranno a macrofagi nei tessuti (linea monocito-macrofagica).

Stesso precursore dei granulociti.

Monoblasto, presente solo nel midollo osseo, acquisisce motilità e aumenta il numero di lisosmi durante la maturazione.

Prevede:

- Formazione di granuli con perossidasi e fosfatasi acida associata a capacità di fagocitare i batteri e di legare le IgG (promonocito)
- Nucleo di grandi dimensioni e formazione di numerosi vacuoli associata ad acquisizione di mobilità ameboide (monociti circolanti. Circa 2-10% dei globuli bianchi del sangue periferico)
- Acquisizione di mobilità completa e di capacità di rilascio citochinico (macrofagi tissutali)



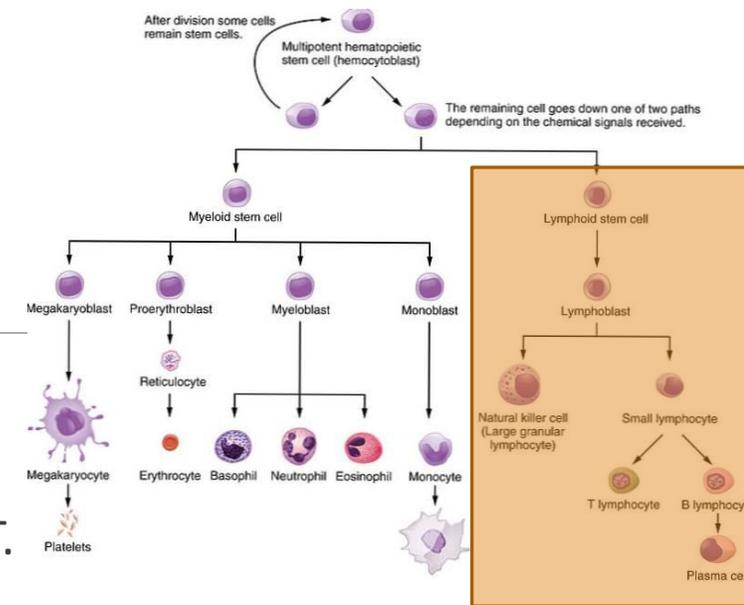
# Linfopoiesi e linfociti

Origina dalla cellula staminale commissionata per la linea linfoide ed è guidata dal microambiente: midollo osseo lineage B e NK; Timo lineage T.

Oltre al timo, i precursori B e T maturano in siti periferici quali milza e linfonodi.

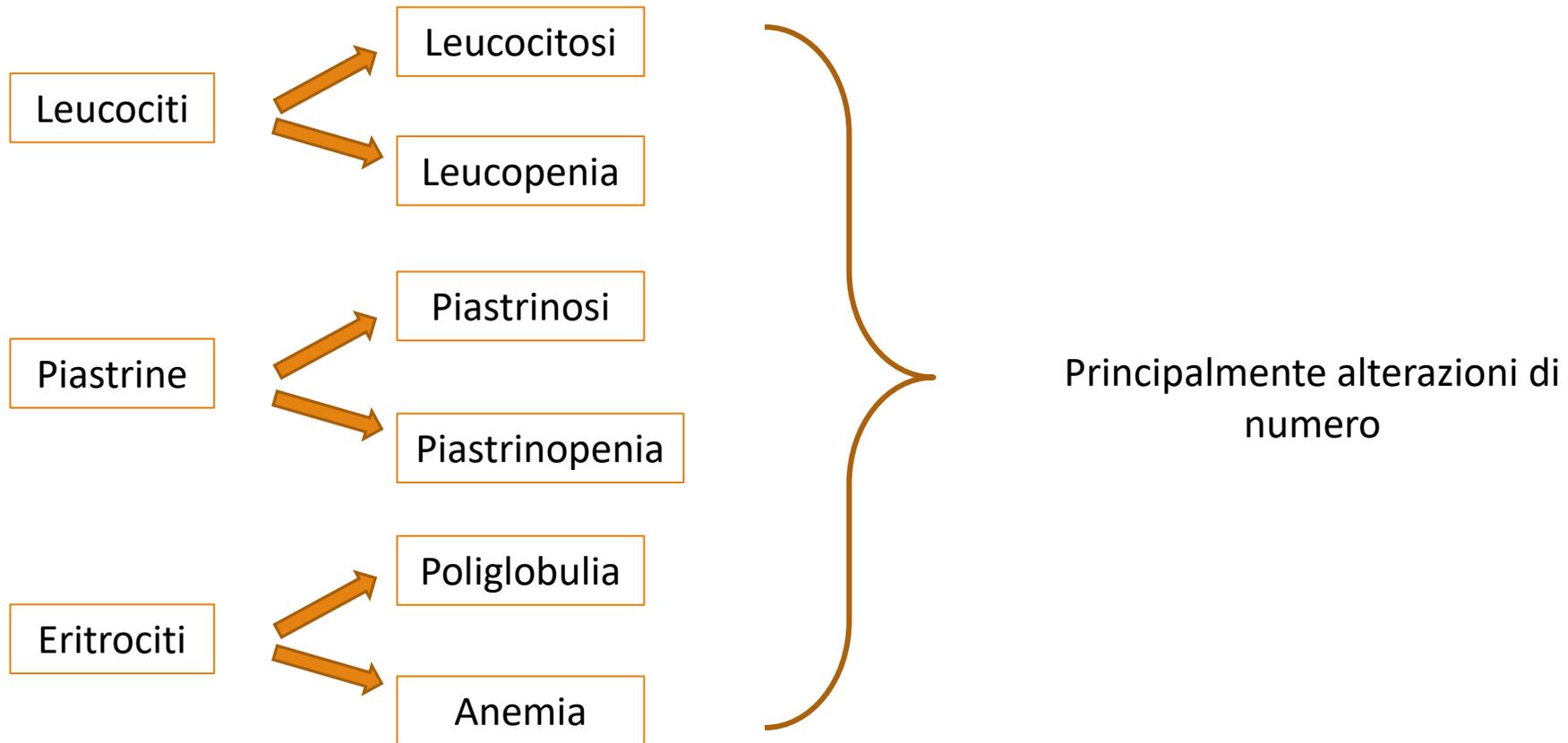
Prevede:

- Progressiva perdita della capacità mitotica (da linfoblasto a pro-linfociti)
- In seguito a differenziamento e maturazione, comparsa di recettori e marcatori specifici dei diversi linfociti maturi: linfociti T (60-80%), linfociti B (5-10%) e cellule ad attività NK (5-20%).
- I linfociti T potranno poi specializzarsi in vari sottotipi (Treg; T helper ecc), mentre i B differenzieranno in plasmacellule (produttrici di anticorpi) e in cellule della memoria.



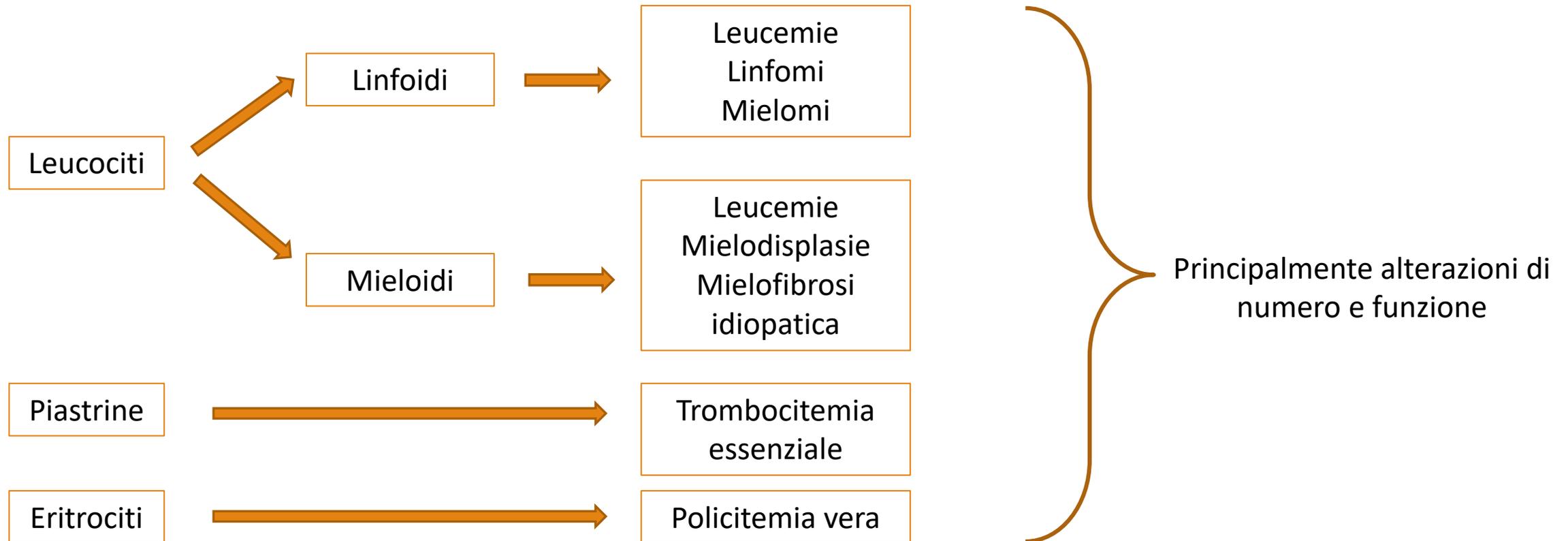
# Alterazioni non neoplastiche

---



# Alterazioni neoplastiche

---

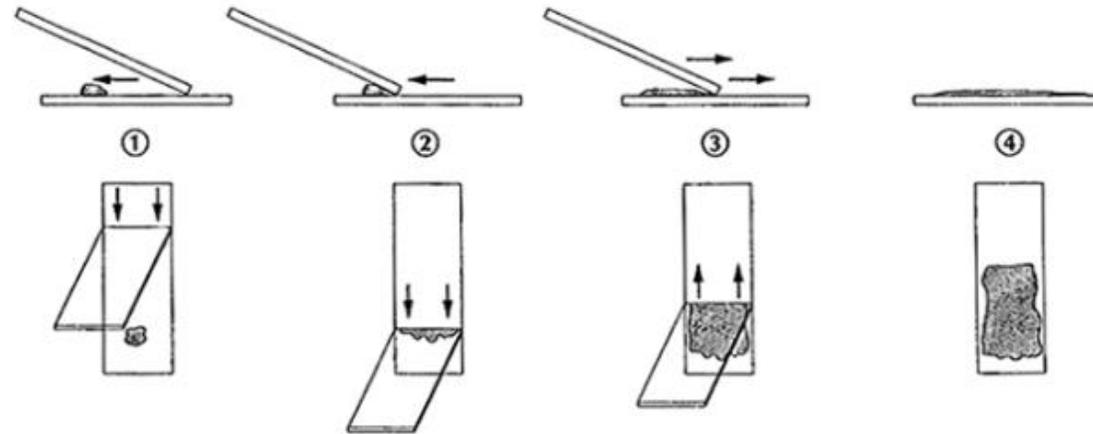


# Citomorfoologia e laboratorio di base

---

# Esame morfologico del sangue periferico

## STRISCIO: ESECUZIONE CORRETTA DELLO STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO



1. Depositare una goccia di sangue su un vetrino di supporto e appoggiare un secondo vetrino inclinato a 40° circa
2. Far aderire il bordo del secondo vetrino alla goccia di sangue e far diffondere il fluido lungo il fronte
3. Tirare il secondo vetrino in direzione opposta con un movimento uniforme e non a scatti
4. Staccare il secondo vetrino e procedere con l'analisi

# Esame morfologico del sangue periferico

---

**COLORAZIONE:** May-Grunwald-Giemsa (Blu di Metilene /Eosina+Azur II/Eosina)

**May-Grunwald:** **Eosina** (colorazione rosa-rosso) e **Blu di Metilene** (colorazione blu-viola)

**Giemsa:** **Eosina** (colorazione rosa-rosso) e **Azur II** (colorazione azzurro-grigio)

**Colorazione 1°:** May-Grunwald su tutta la superficie per 2'

aggiunta di H<sub>2</sub>O (1:2) per 2'e poi scolo

**Colorazione 2°:** Giemsa 1:10 con H<sub>2</sub>O per 10'.

lavare con H<sub>2</sub>O e lasciare asciugare

# Esame morfologico del sangue periferico

---

**COLORAZIONE:** May-Grunwal-Giemsa (Blu di Metilene/Eosina-Azur II/Eosina)

NUCLEO: blu violetto

CITOPLASMA: roseo (eosinofilo)

blu (basofilo)

grigiastro (policromatofilo)

GRANULAZIONI: rosa chiaro (neutrofile)

rosso arancio (eosinofile)

viola scuro (basofile)

rosso vivo (azzurrofile)

# Esame morfologico del sangue periferico

---

**COLORAZIONE:** May-Grunwal-Giemsa

ERITROCITI: rosso chiaro/grigio

NEUTROFILI: nucleo blu/viola

BASOFILI: granuli blu intenso/viola scuro e nucleo coperto

EOSINOFILI: granuli rossi e nucleo coperto

LINFOCITI: nucleo molto grande e blu

MONOCITI: sono le cellule più grandi e hanno il nucleo blu

# Esame morfologico del sangue periferico

---

## **ANALISI MICROSCOPICA: Microscopio ottico**

PICCOLO INGRANDIMENTO: adeguatezza del preparato

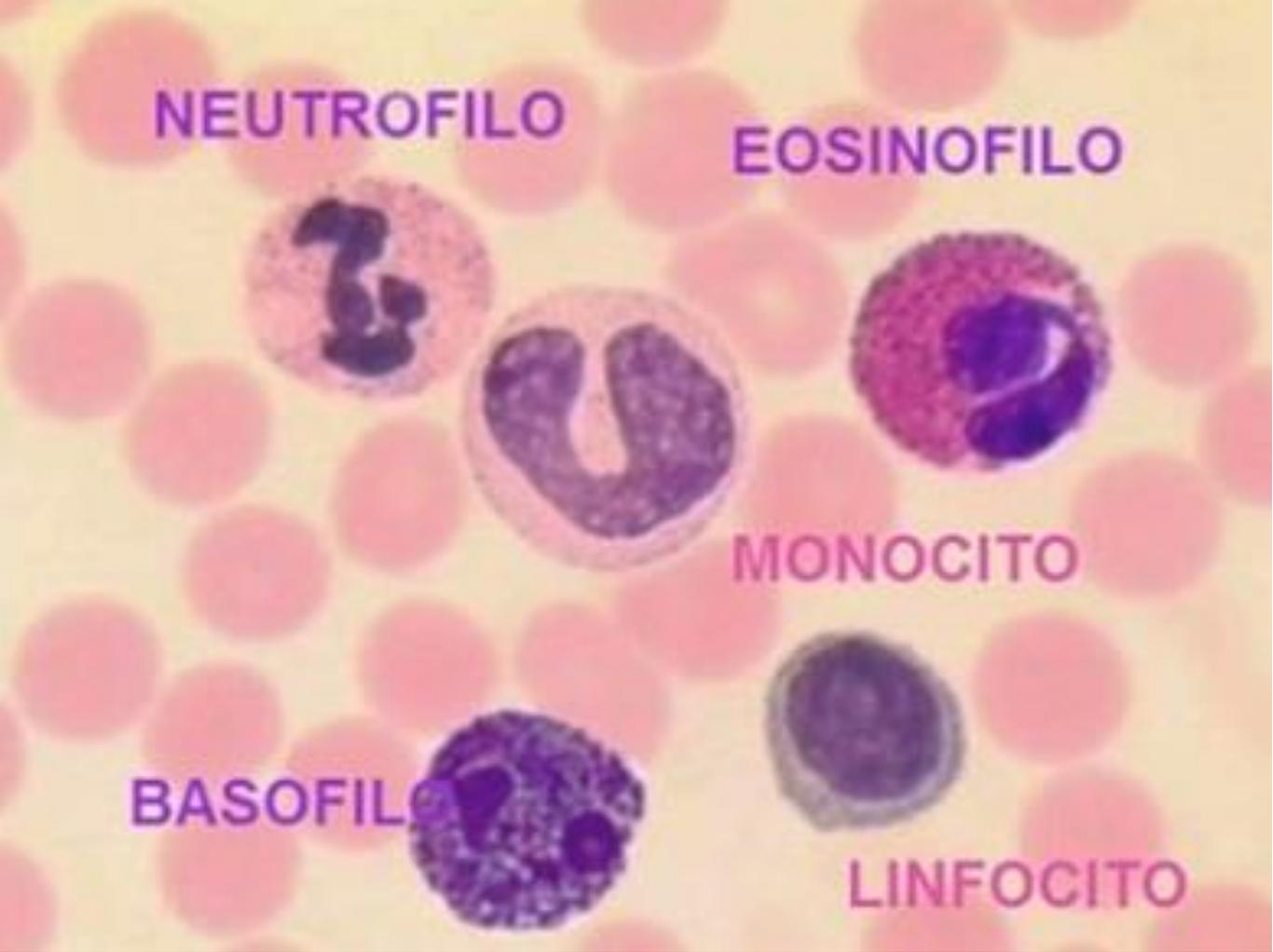
identifico area di analisi

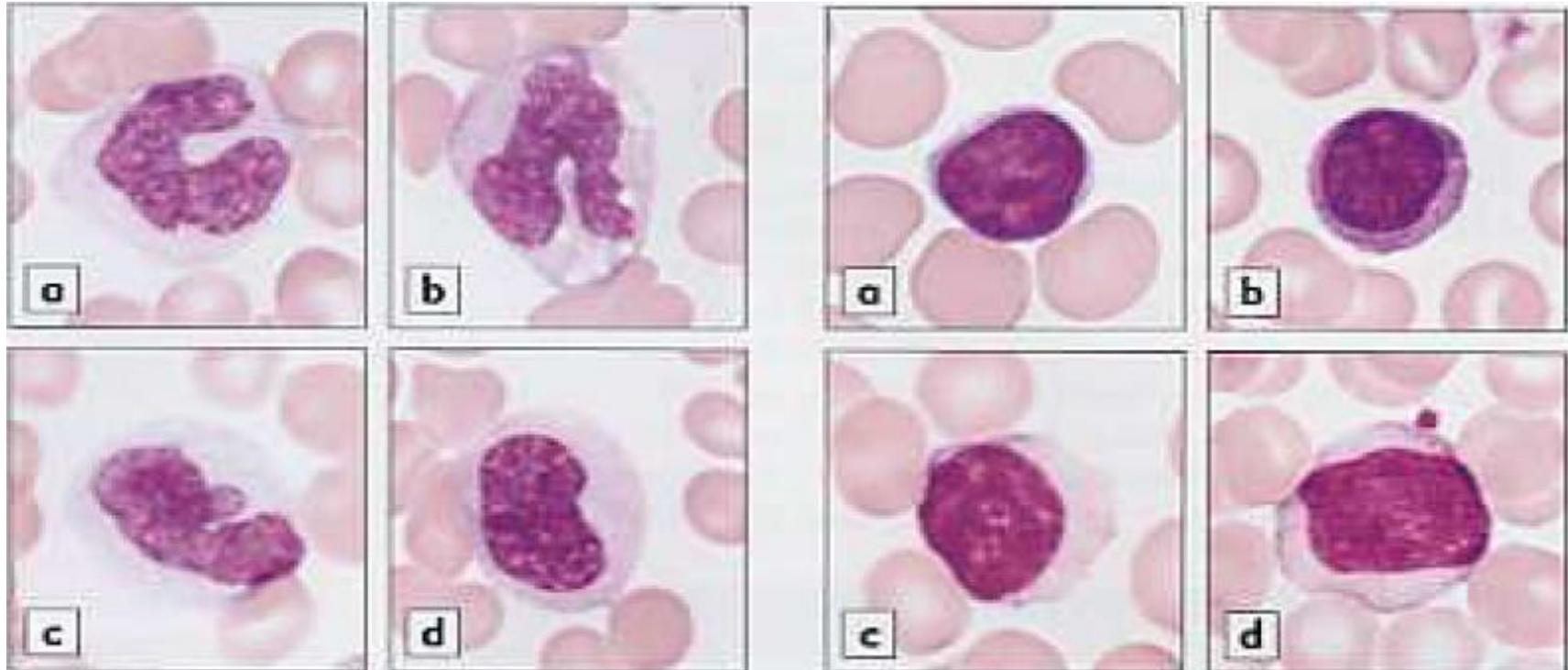
MEDIO INGRANDIMENTO: analisi morfologica dei leucociti

analisi morfologica degli eritrociti

MAGGIORE INGRANDIMENTO: dettagli citologici quali

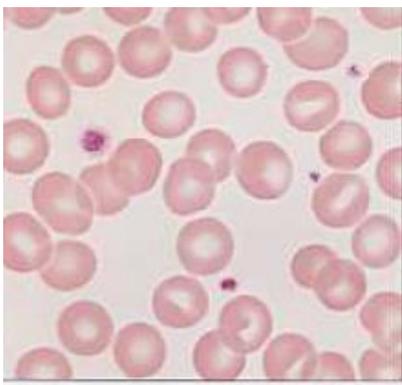
- citoplasma
- nucleo
- granulazioni





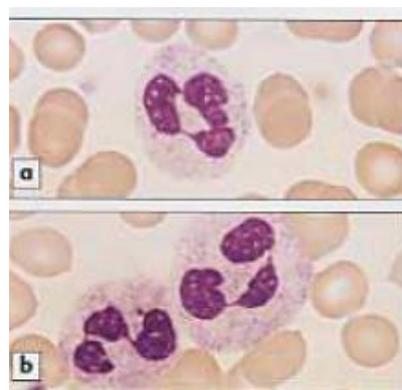
MONOCITI: sono la maggior parte dei globuli bianchi nei sani. Il nucleo può essere convoluto con un pattern cromatinico buono. Il citoplasma ha di solito una colorazione grigiasta con effetto-vetro e granuli azurofili. Quando infiltrano i tessuti diventano macrofagi e fagocitano cellule senescenti e detriti.

LINFOCITI: sono normalmente dai 7-12um nei sani. Oltre i 20um se ho infezioni. Il citoplasma è azzurro chiaro e molto ridotto rispetto al nucleo. Quest'ultimo è centrale, tondeggiante e un pattern cromatinico amorfo.

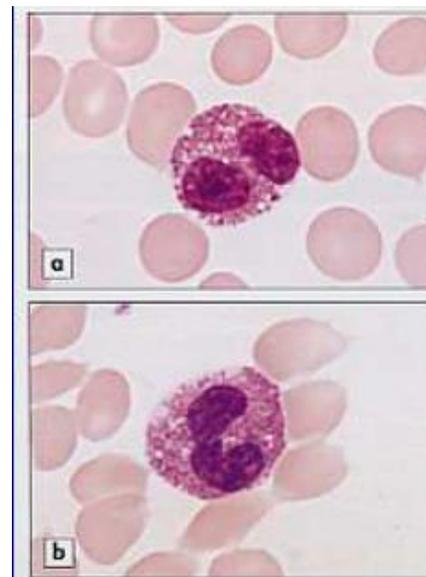


ERITROCITI:  
mediamente 8um  
con area centrale  
ipocromatica.

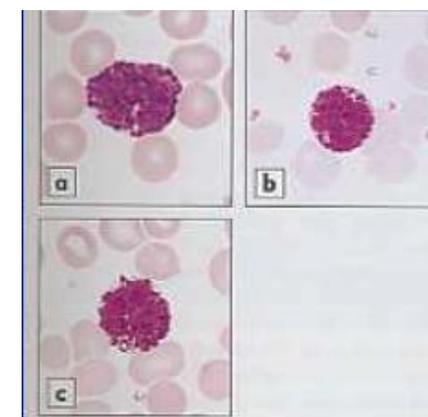
PIASTRINE:  
mediamente 1-3um,  
staining rosso-viola  
evidente. Si può  
distinguere una zona  
granulare. Vivono  
mediamente 8-12  
giorni.



NEUTROFILI: nella  
forma matura hanno  
il nucleo lobato  
separato da filamenti  
(polimorfonucleati).  
Arrivano fino a 5  
lobi. Generalmente  
vi si apprezzano i  
corpi di Barr.  
Rappresentano il 60-  
70% dei globuli  
bianchi e fagocitano  
batteri e funghi.



EOSINOFILI:  
normalmente sono il  
2-4% e presentano  
due segmenti nucleari.  
Nel citoplasma, le  
granulazioni eosinofile  
che possono coprire il  
nucleo. Reazione  
immuno-allergica,  
infiammazione e  
reazione contro  
elminti.



BASOFILI: I granuli  
basofili spesso  
nascondono il nucleo,  
impedendone l'analisi  
dei dettagli o delle  
strutture. Nei sani  
sono in numero  
limitato (<1%).  
Rilasciando istamina  
ed eparina, inducono  
le modificazioni  
vascolari necessarie al  
processo  
infiammatorio.

# Esame morfologico del sangue midollare

---

## AGO ASPIRATO MIDOLLARE

LEUCOCITOSI/LEUCOPENIA con o senza ANEMIA E PIASTRINOPENIA (LA, MDS, aplasia)

STADIAZIONE O ESORDIO DI MALATTIA LINFOPROLIFERATIVA (cHL)

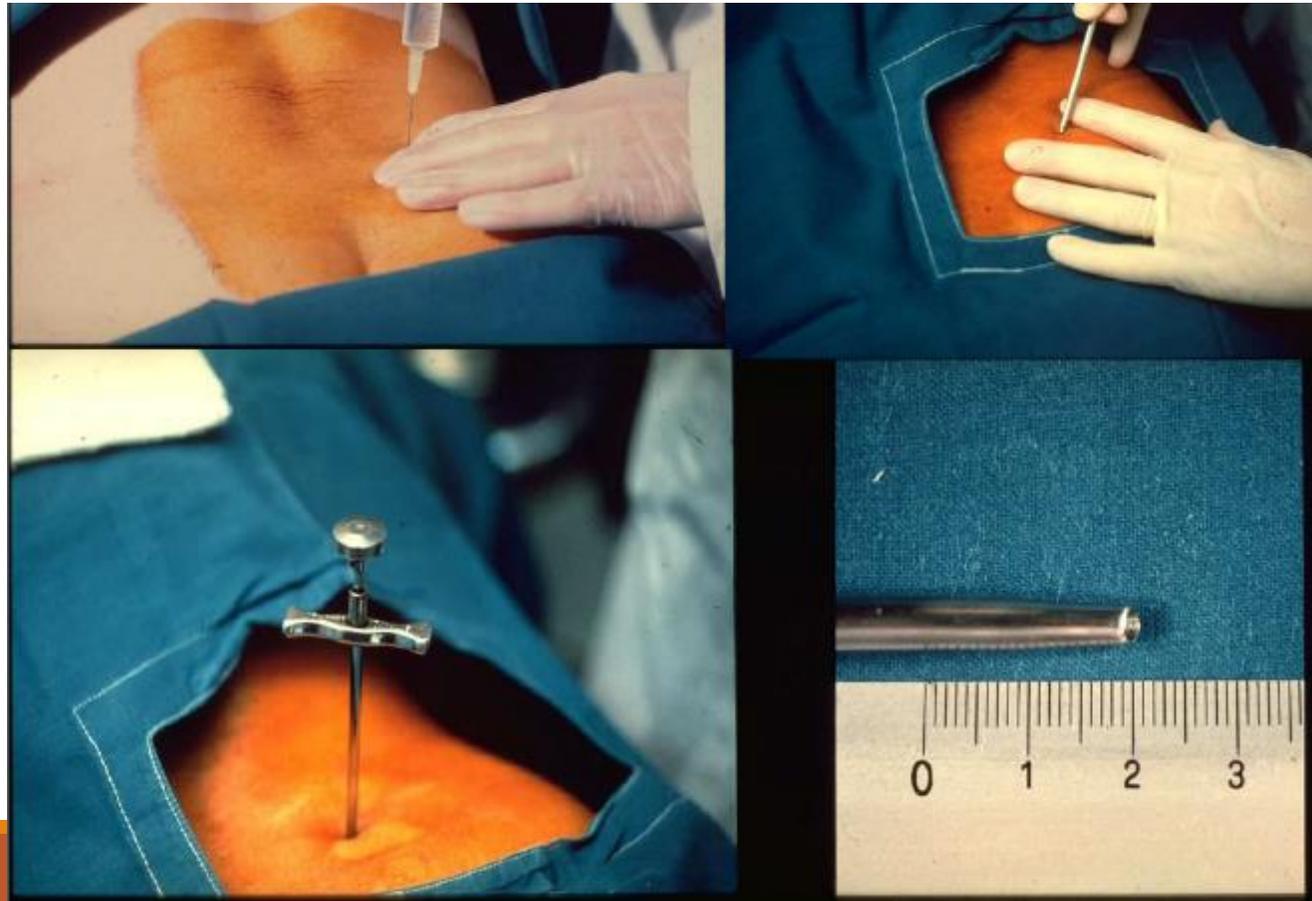
ANEMIA MACROCITICA O NORMOCITICA

ALTERAZIONI DELLE Ig (componente monoclonale)

ALCUNE INFEZIONI (malaria)

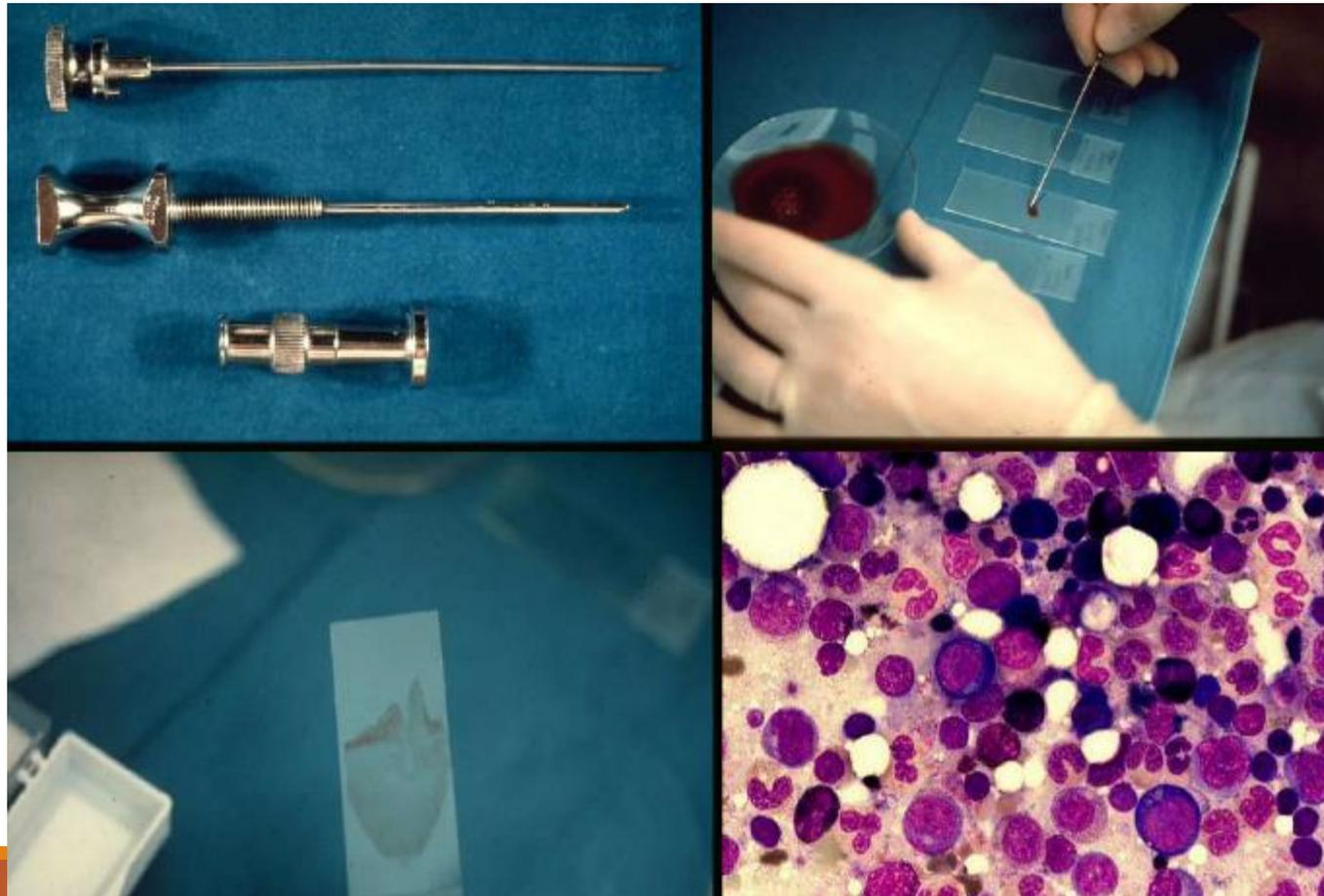
# Esame morfologico del sangue midollare

## AGO ASPIRATO MIDOLLARE



# Esame morfologico del sangue midollare

## AGO ASPIRATO MIDOLLARE



# Esame morfologico del sangue midollare

---

BIOPSIA OSSEA (densità cellulare, rapporto cellule/stroma, infiltrato di cellule estranee)

PANCITOPENIA

PUNCTIO SICCA

STADIAZIONE O ESORDIO DI MALATTIA LINFOPROLIFERATIVA (cHL)\*

SINDROMI MIELO O LINFOPROLIFERATIVE CRONICHE

ALTERAZIONI DELLE Ig (componente monoclonale)\*

SOSPETTA INFILTRAZIONE DA NEOPLASIE SOLIDE

# Esame morfologico del sangue midollare

## BIOPSIA OSSEA

- Dolorosa
- Sala operatoria e DH
- Ago e mandrino di dimensioni maggiori
- Prevede l'incisione della cute
- Il mandrino interno consente il prelievo di un cilindro di tessuto.



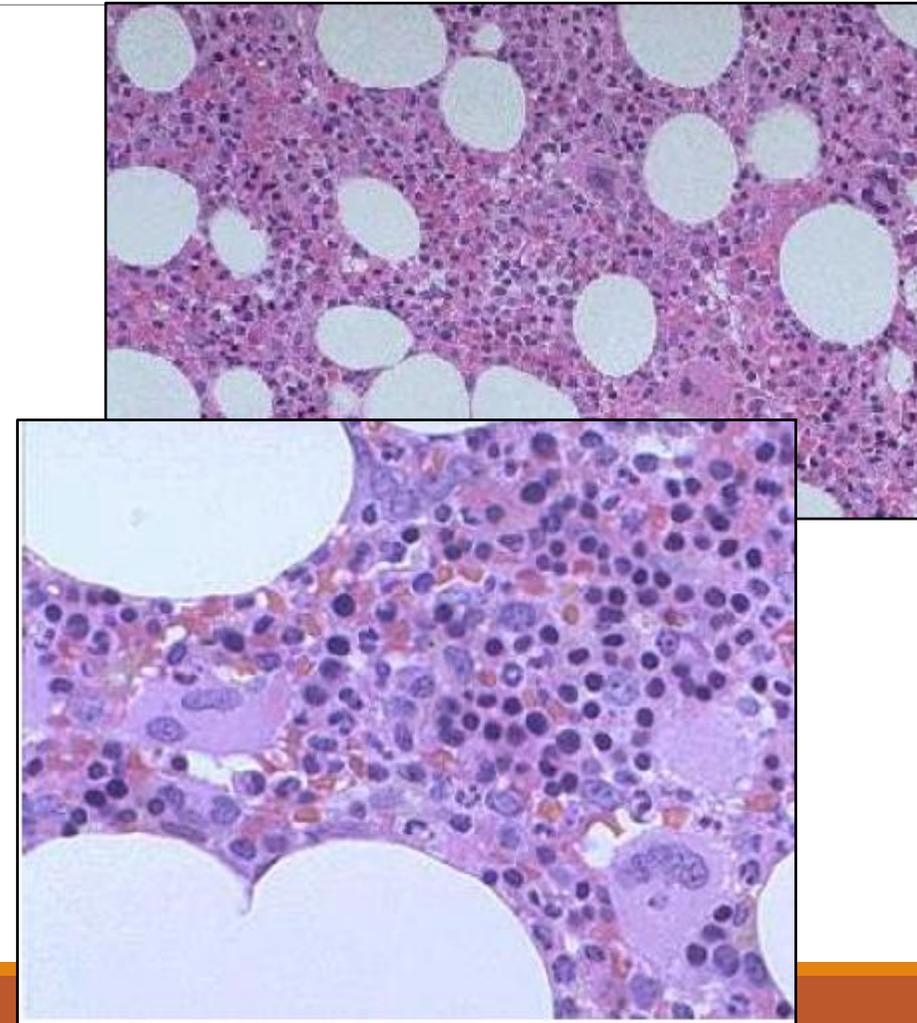
# Esame morfologico del sangue midollare

## MIDOLLO OSSEO NORMALE: istologia

A medio ingrandimento si apprezzano isolotti di eritroblasti, precursori della granulopoiesi e megacarioblasti.

Cellularità media del 50%.

Presenza di adipociti frapposti alle cellule della mielopoiesi



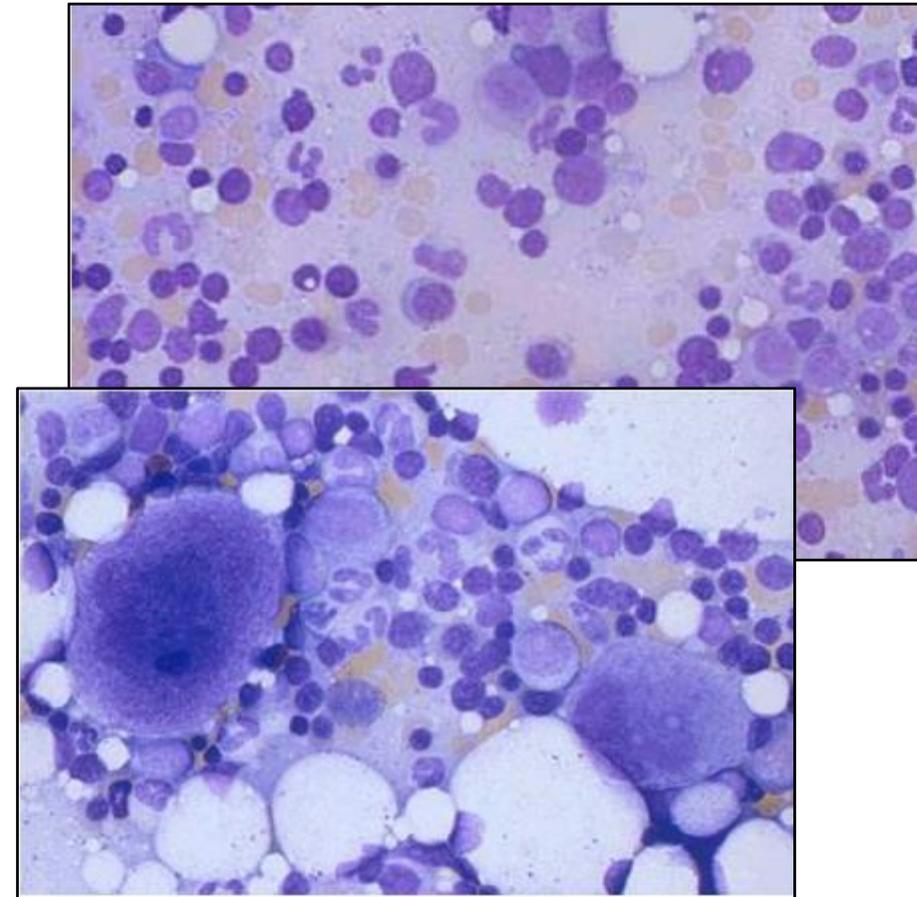
# Esame morfologico del sangue midollare

---

## MIDOLLO OSSEO NORMALE: citologia

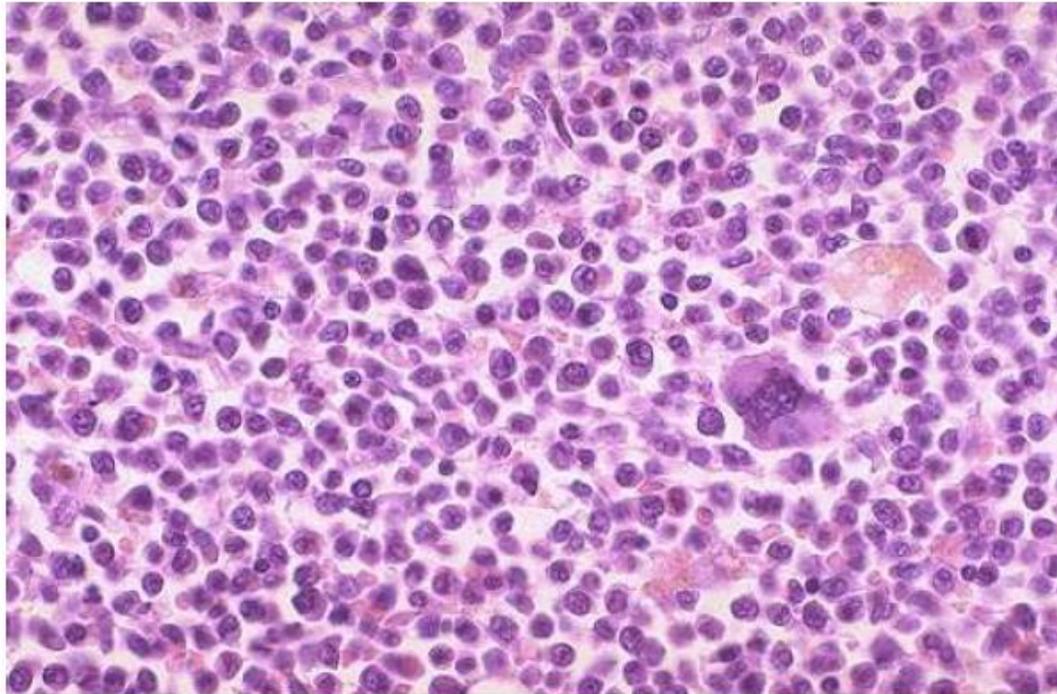
A medio ingrandimento si apprezzano isolotti di eritroblasti, precursori della granulopoiesi e megacarioblasti.

Quadro polimorfico con cellule variabili in morfologia e dimensioni.



# Esame morfologico Leucemia Acuta Mieloide

---



**Midollo osseo a forte ingrandimento, in un caso di leucemia acuta mieloide.**

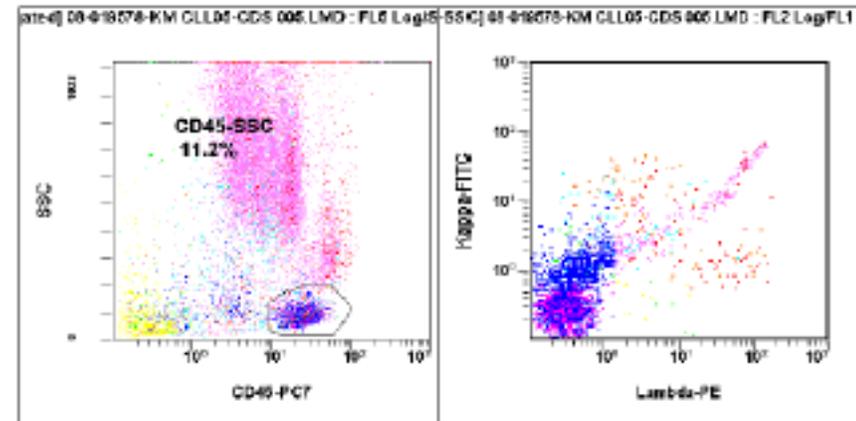
**La popolazione cellulare è monomorfa, costituita quasi esclusivamente da cellule leucemiche.**

**Si osserva un megacariocito**

# Analisi Immunofenotipica

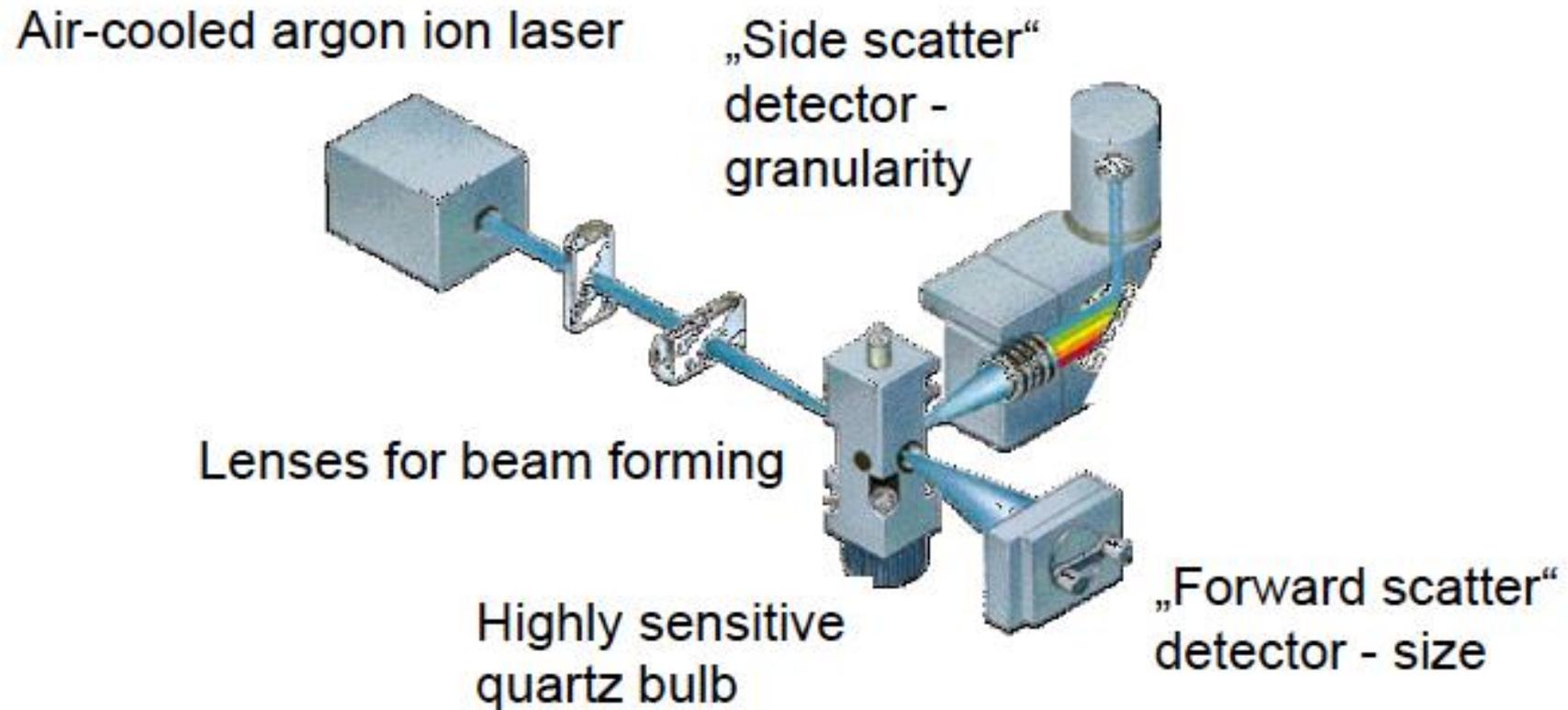
## INDICAZIONI

- SINTOMI CLINICI
- CITOPENIA
- LEUCOCITOSI
- PRESENZA DI CELLULE ATIPICHE/BLASTI
- PATOLOGIE DELLE PLASMACELLE
- ORGANOMEGALIA O MASSE TISSUTALI
- MONITORAGGIO DELL'MRD



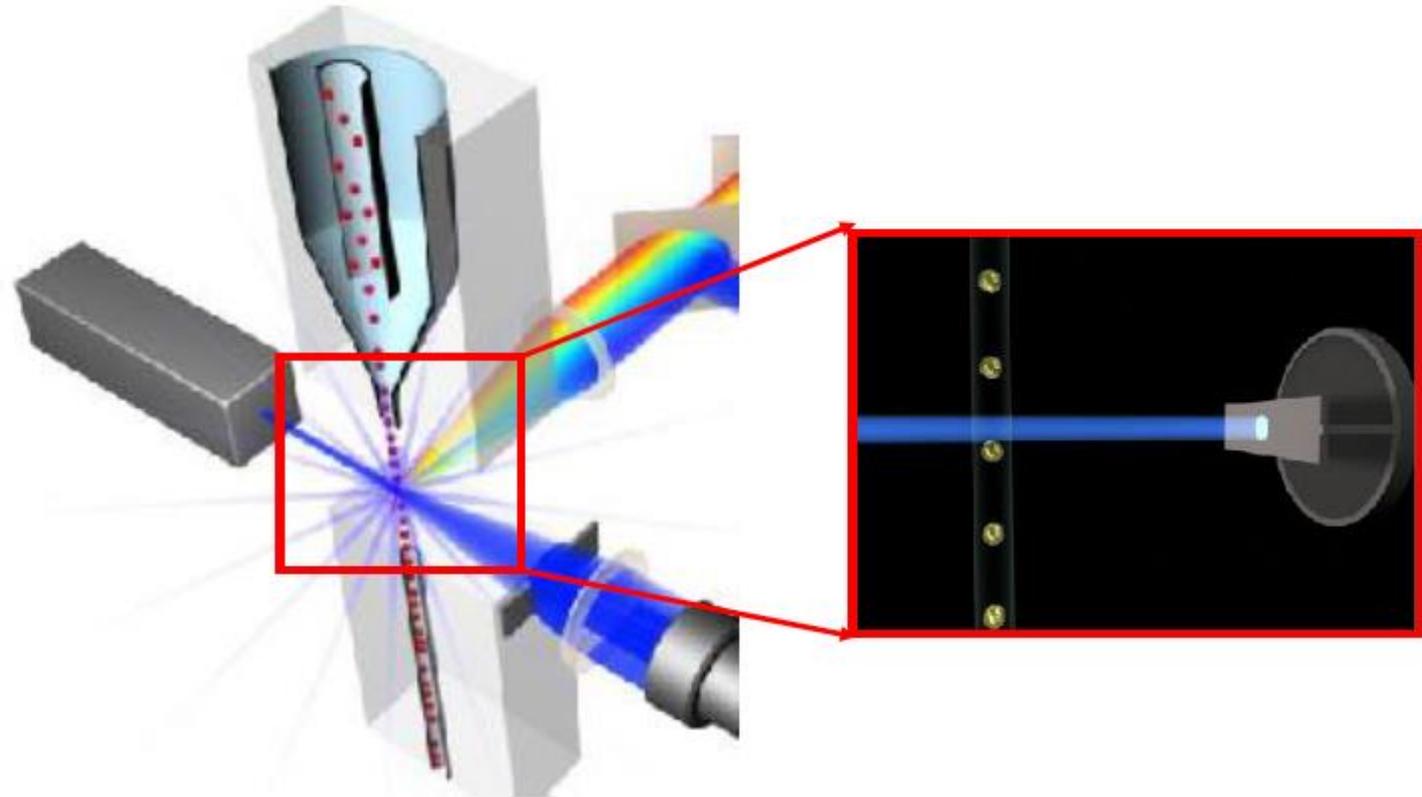
# Citofluorimetro

---



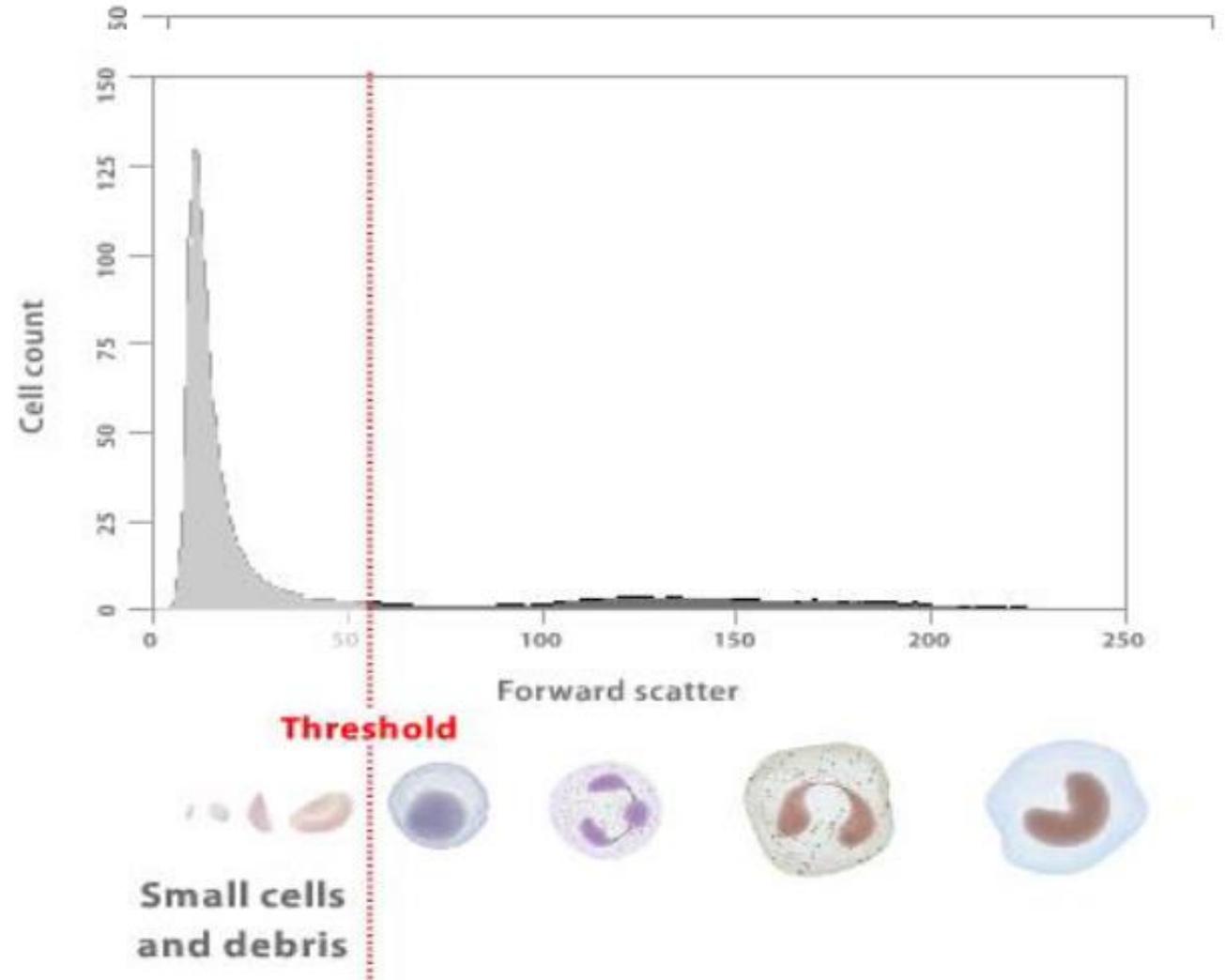
# Citofluorimetro

Focusing idrodinamico



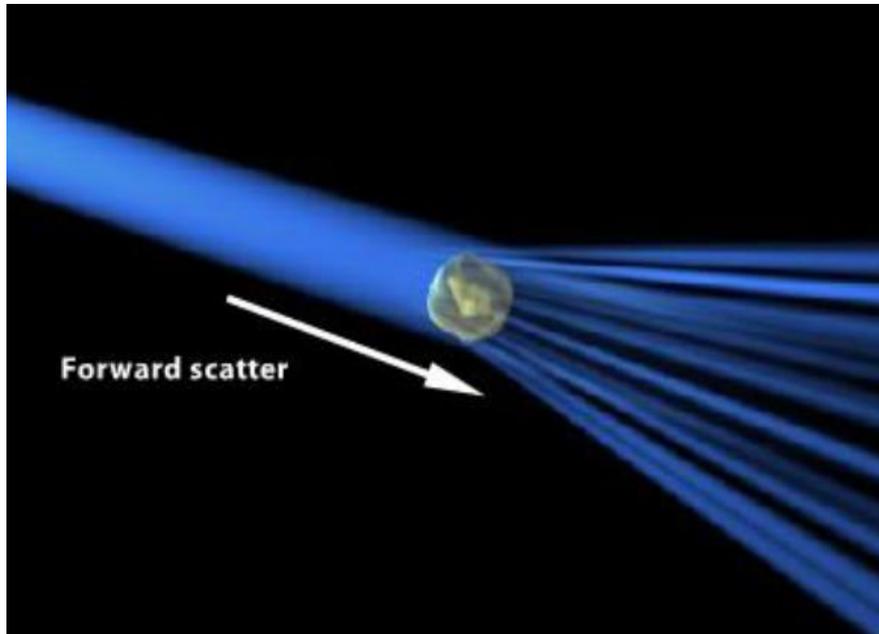
# Citofluorimetro

---

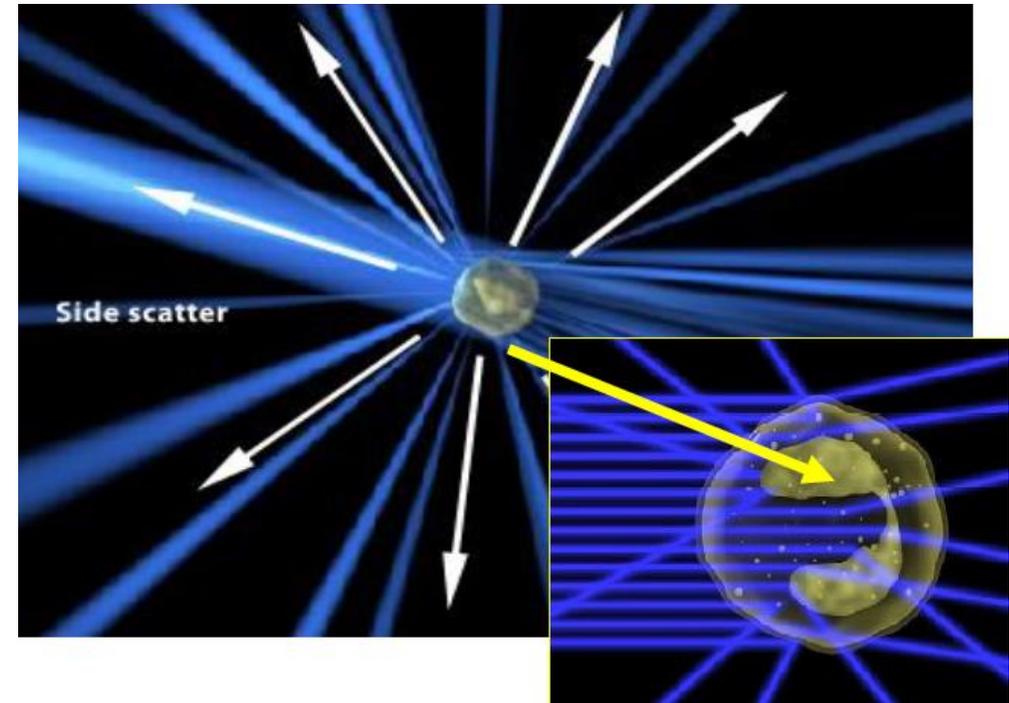


# Citofluorimetro

DIMENSIONE

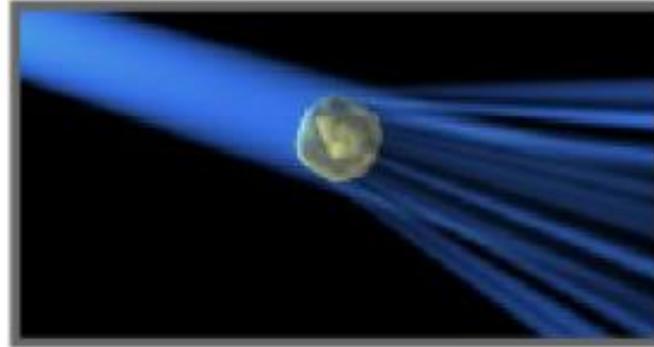


COMPLESSITA'

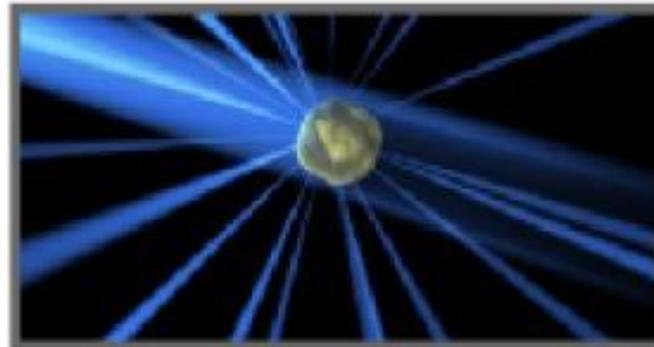
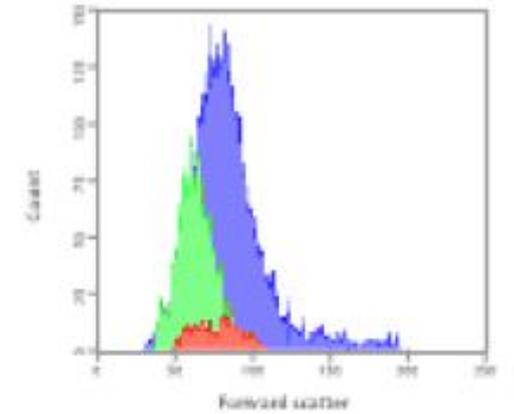


# Citofluorimetro

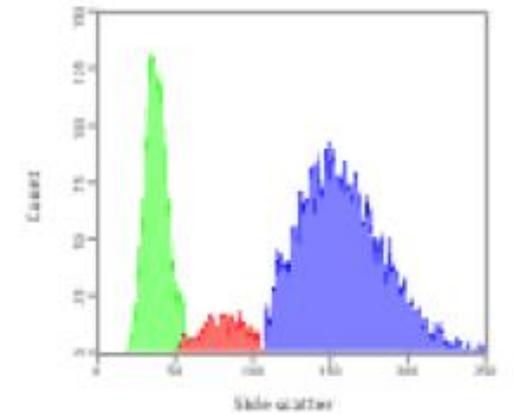
---



Forward scatter

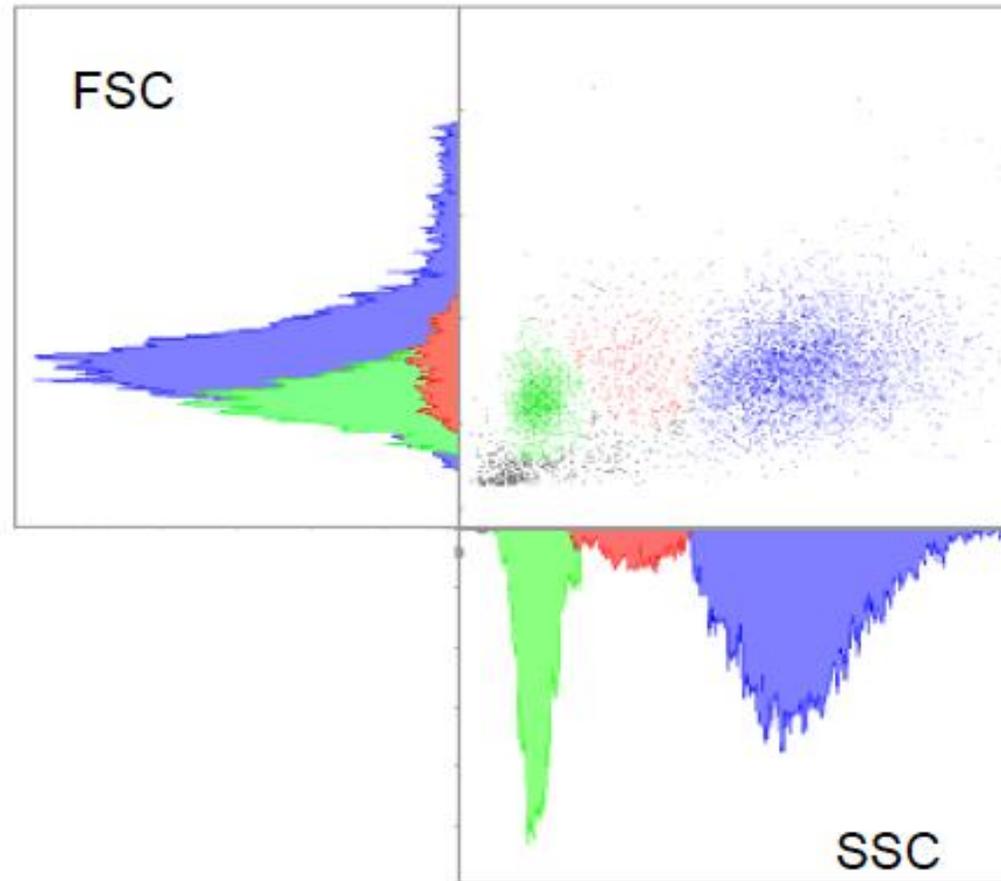


Side scatter

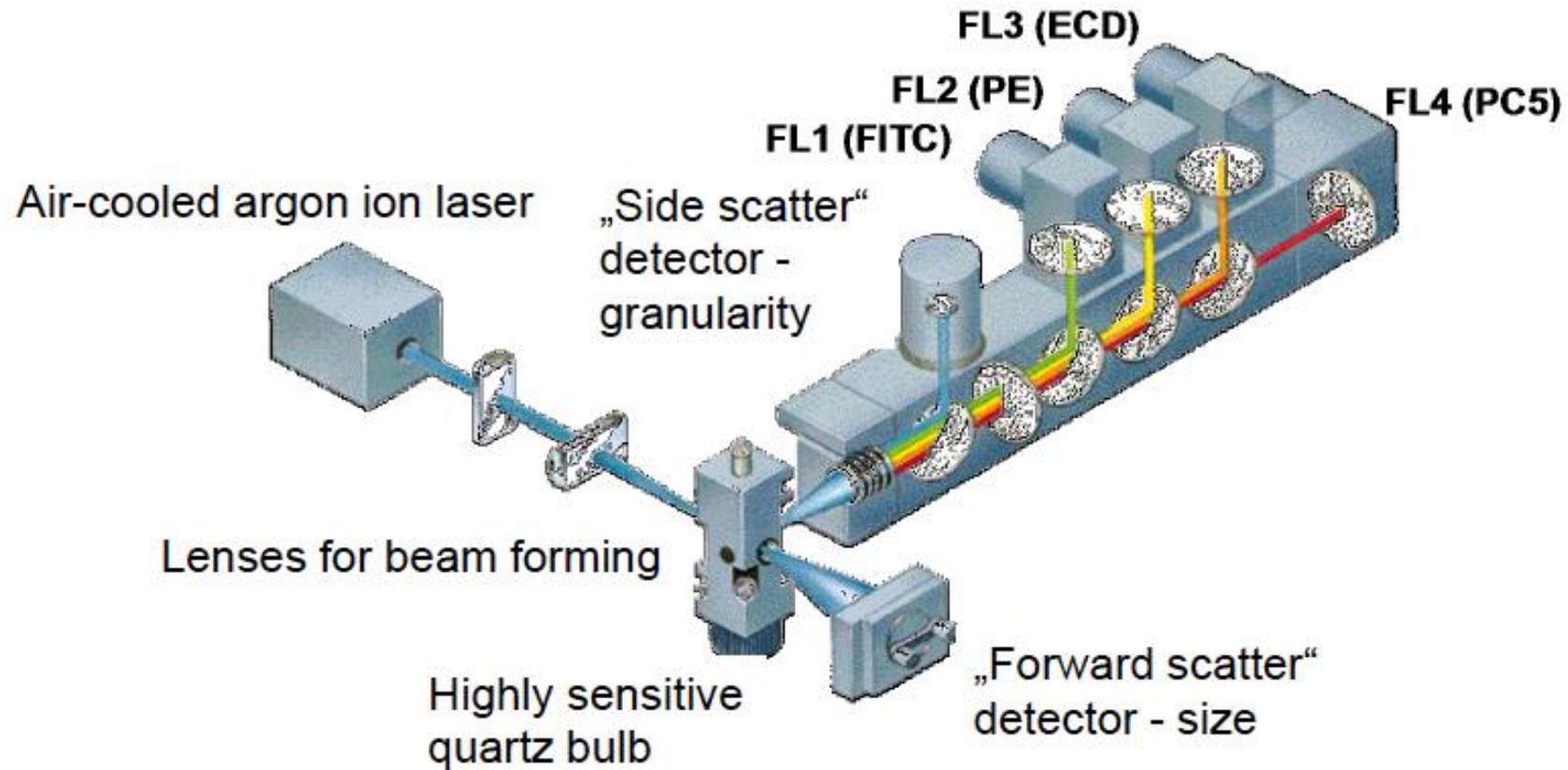


# Citofluorimetro: citogramma

---

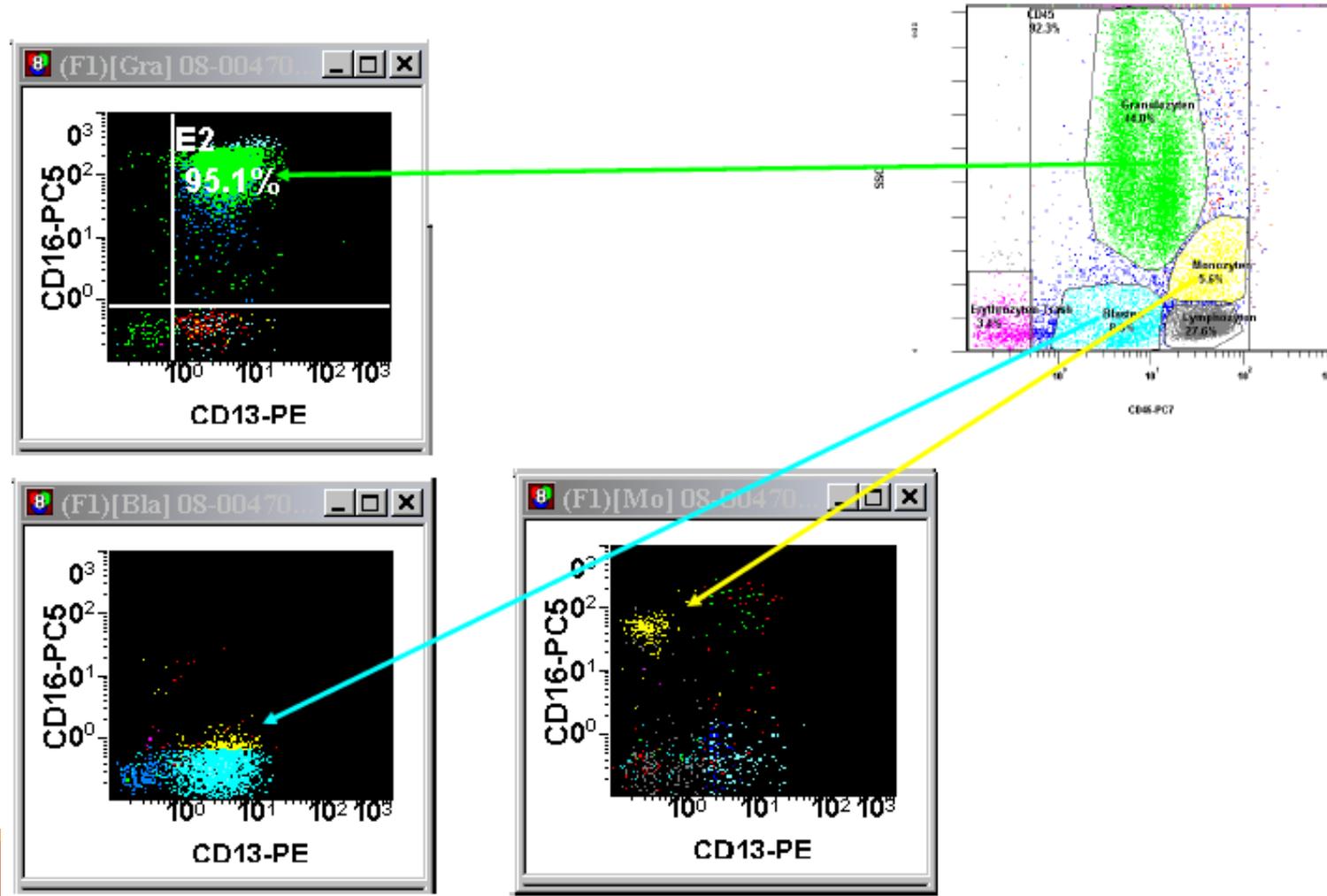


# Citofluorimetro: i colori





# Citofluorimetro: il gating



# Immunofenotipi normali

---

## STEM CELL:

CD34+  
CD33+/-

## BLASTO MIELOIDE:

CD13+  
CD33+  
CD34+

## LINFOCITI B:

CD79a+  
CD20+  
CD22+  
CD19+  
sIgM+

## GRANULOCITI:

CD13+  
CD33+/-  
CD66c+ CD66b+  
CD11c+ CD11b+ CD11a+  
CD16+  
CD15+

## MONOCITI:

CD13+  
CD33+  
CD36+  
CD11b+  
CD14+  
CD64+

# Immunofenotipi tipici: LAIP

---

## HAIRY CELL LEUKEMIA:

SSC FORTE

CD103+

CD11c+

CD25+

## CLL (90% dei casi):

CD5+

CD23+

FMC7-

sIgM(+)

aCD22(+) o CD79b(+)

## LINFOMA FOLLICOLARE:

CD10+ DEBOLE

CD19+ DEBOLE

## DLBCL:

CD10+

LIGHT CHAIN (Kappa/Lambda)

## MIELOMA:

CD45-

CD38+-

CD138+

CD56+

CD19-CD20+