

TECNICHE PER LO STUDIO DELL' EMOPOIESI NORMALE E PATOLOGICA

DR.SSA FEDERICA RE

*Chair of Hematology - Unit of Bone Marrow
Transplantation*

University of Brescia

federica.re@unibs.it



UNIVERSITY
OF BRESCIA



AGENDA

- **INTRODUZIONE ALL' EMOPOIESI NORMALE E PATOLOGICA**
- **ESAME EMOCROMOCITOMETRICO**
- **ESAME MORFOLOGICO DEL SANGUE PERIFERICO**
- **ESAME MORFOLOGICO DEL SANGUE MIDOLLARE**
- **CITOFUORIMETRIA**
- **NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)**

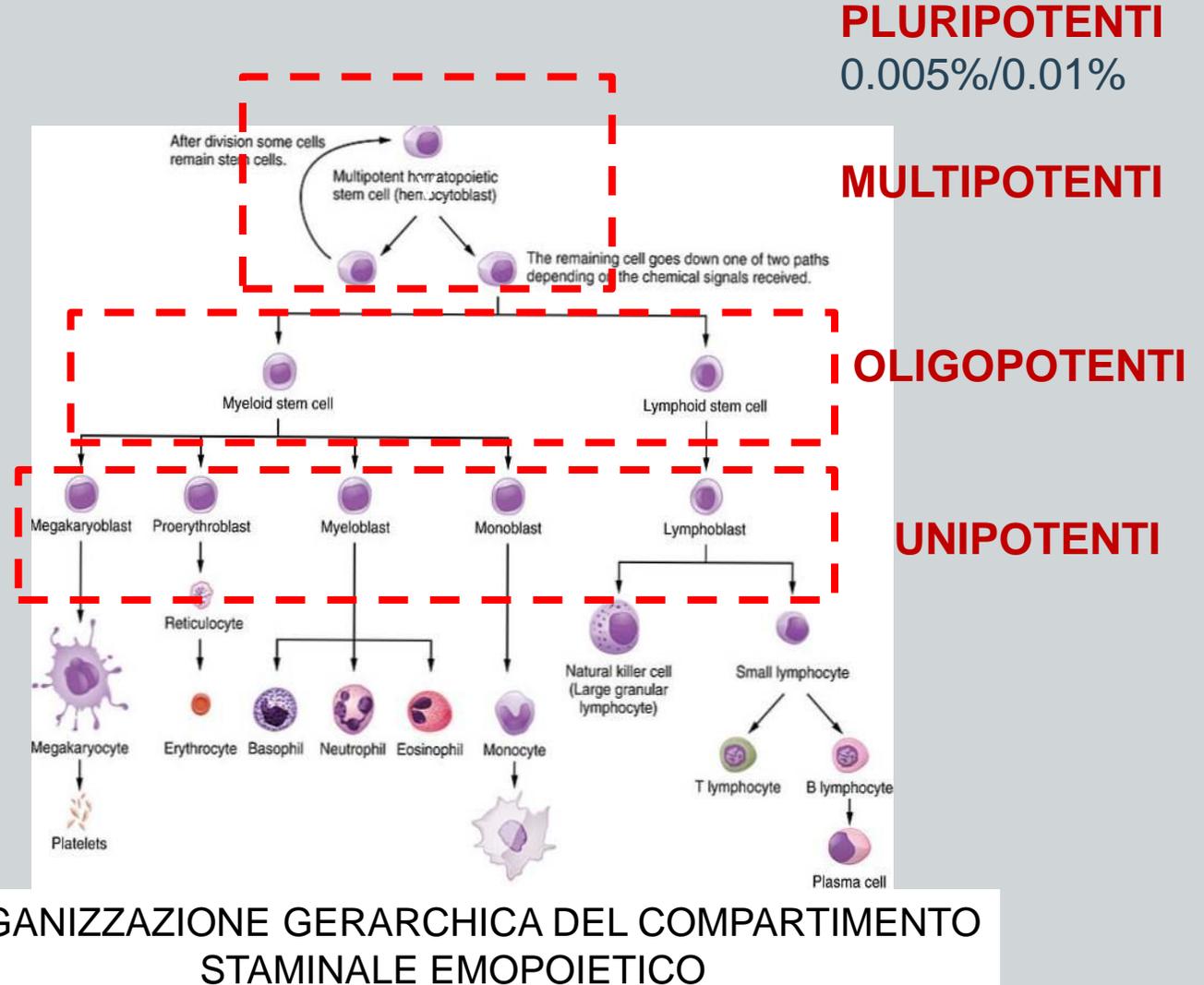
EMOPOIESI

«Produzione di sangue»

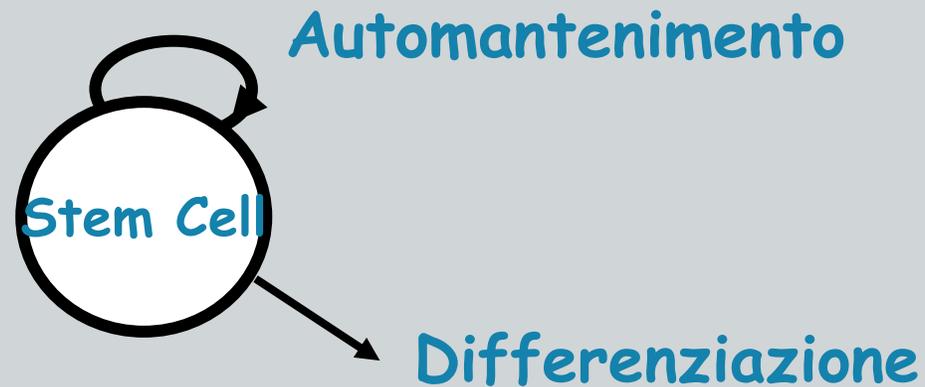
□ Insieme dei processi che regolano il mantenimento del numero fisiologico di cellule circolanti nel sangue in condizioni di omeostasi e intervengono come compenso in caso della richiesta da parte dell'organismo.

■ Si svolge principalmente nel midollo osseo: **NICCHIA EMOPOIETICA.**

■ Parte dalla **cellula staminale emopoietica (HSCs).**



CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE



- Popolazione rara (0.005%/0.01% di tutta la popolazione midollare)

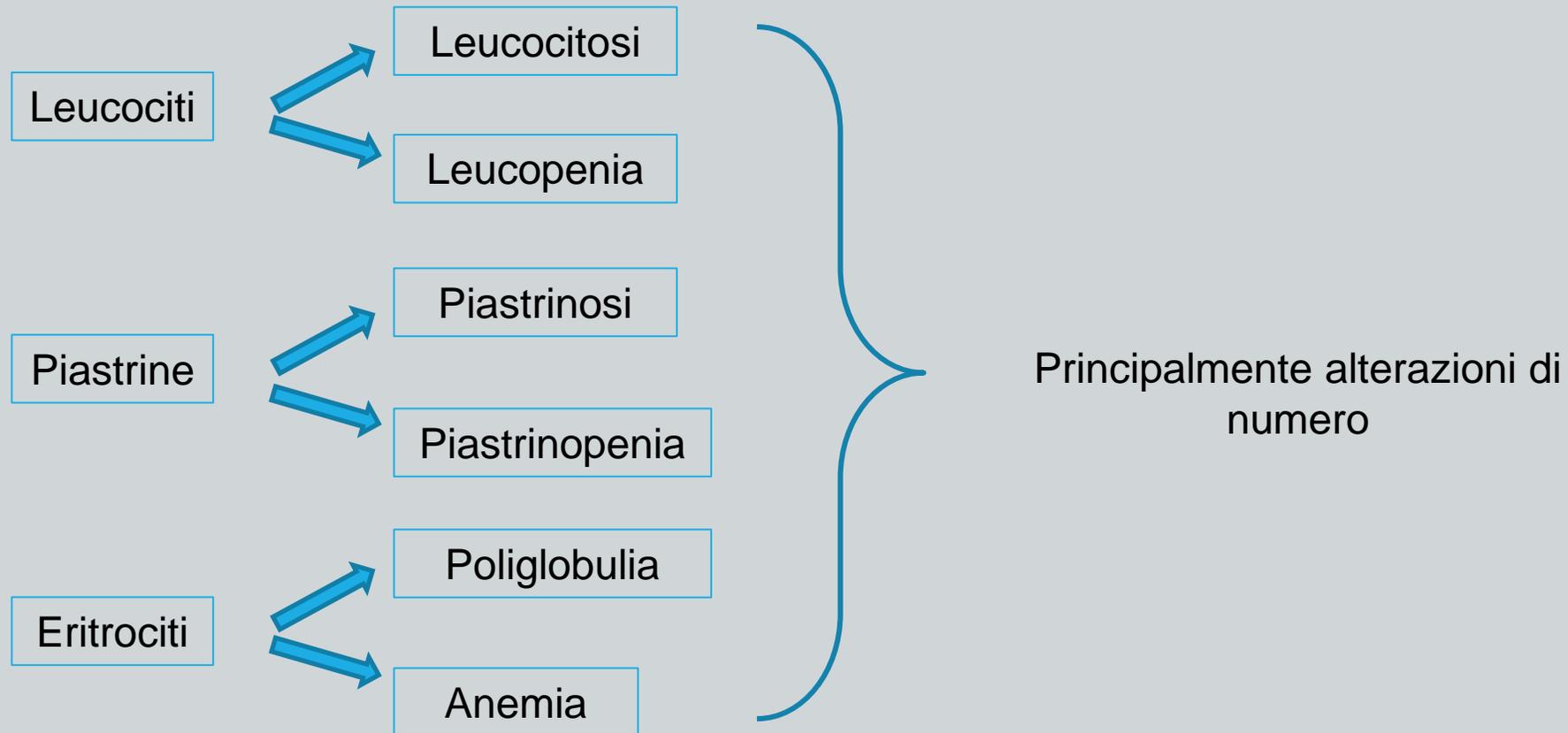
PROPRIETA':

- (1) capacità di "self-renewal" o **autorinnovamento**
- (2) la **pluripotenzialità**: capacità di dare origine a tutte le cellule terminalmente differenziate del sangue

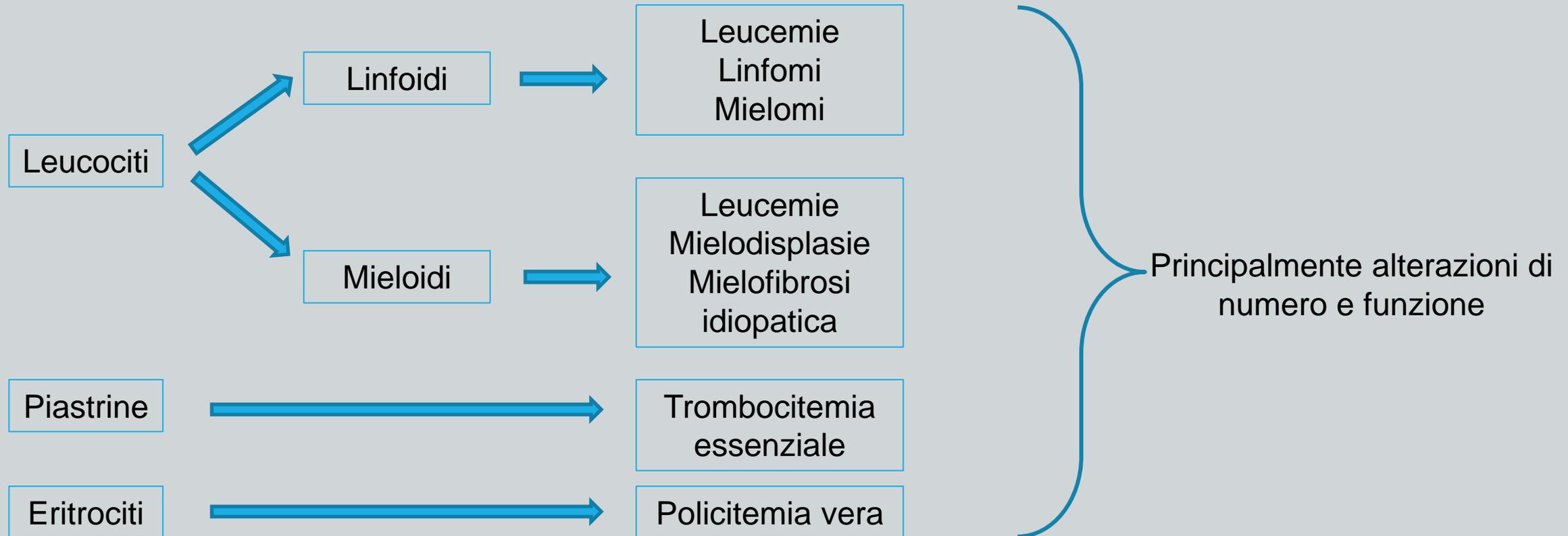
CONSEGUENZE: 1) mantenimento omeostasi emopoietica; 2) HSCs trapiantate in grado di rigenerare il sistema emopoietico per tutta la vita

- Marcatore fenotipico: **CD34+**
- È possibile distinguere 3 sottopopolazioni di HSCs
 - 1) *long-term* HSCs (LT-HSCs)
 - 2) *short-term* HSCs (ST-HSCs)
 - 3) HSCs *multipotenti* (MPP)

ALTERAZIONI NON NEOPLASTICHE



ALTERAZIONI NEOPLASTICHE



Citomorfoologia

e

Laboratorio di base

ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

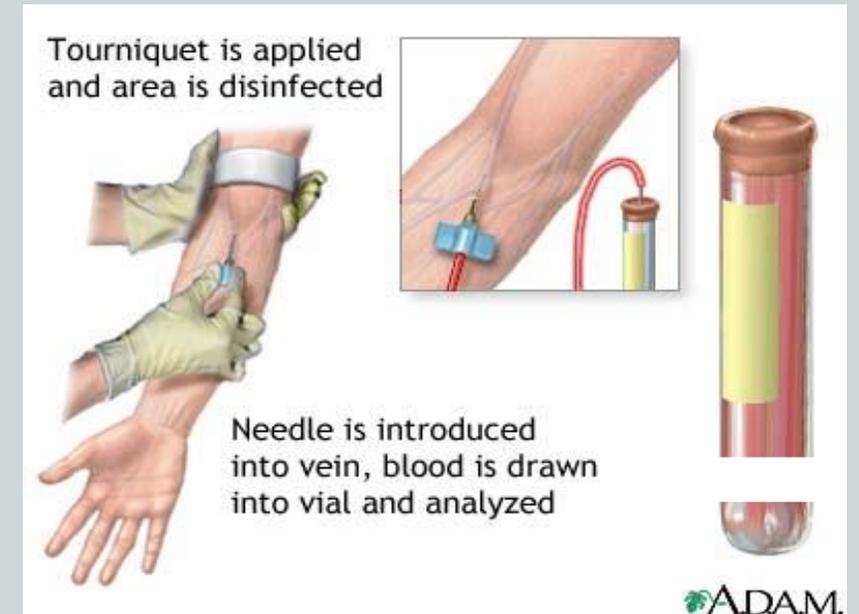
EMOCROMO

Conta degli elementi corpuscolati del sangue:

- leucociti (WBC), globuli rossi (RBC), piastrine
- conta differenziale dei leucociti (granulociti neutrofili, basofili, eosinofili, linfociti, monociti)

INDICI CORPUSCOLARI (informazioni relative ai RBC):

- concentrazione dell'emoglobina (Hb)
- ematocrito (Hct)
- indici eritrocitari (MCV, MCH, MCHC)



ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

STRUMENTI AUTOMATIZZATI PER L'ESECUZIONE DELL'EMOCROMO

Gli «analyzer» automatici sono costituiti da:

- Un campionatore che preleva l'esatta quantità di sangue
- Un sistema di circuiti che distribuiscono il campione nei diversi moduli dell'apparato operanti le singole operazioni programmate

I principi ed i metodi si basano su:

- Metodi ottici (scatter di luce): strumenti Ortho e Technicon
- Impedenza elettrica (Coulter) e/o radio-frequenza
- impedenza + radio-frequenza + scatter di luce





| Esame | Risultati | Unità di misura | Intervallo di riferimento |
|------------------------------------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| ESAME EMOCROMOCITOMETRICO | | | |
| Globuli Bianchi (WBC) | 9.98 | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 4.00 - 10.80 |
| Globuli Rossi (RBC) | 4.41 L | $\times 10^6/\mu\text{L}$ | 4.50 - 5.50 |
| Emoglobina (Hb) | 12.7 L | g/dL | 14.0 - 18.0 |
| Ematocrito (HCT) | 36.8 L | % | 42.0 - 52.0 |
| Volume Globulare medio (MCV) | 83.4 | fL | 82.0 - 94.0 |
| Contenuto Emoglobin. medio (MCH) | 28.8 | pg | 27.0 - 31.0 |
| Conc. cellulare media di Hb (MCHC) | 34.6 | g/dL | 32.0 - 37.0 |
| Distrib. volumi eritrocitari (RDW) | 14.7 | % | 12.0 - 17.0 |
| Piastrine (PLT) | 222 | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 130 - 400 |

EMOGLOBINA (Hb)

quantità di emoglobina nel sangue

unità di misura = gr/dl N = ≥ 13.5 gr/dl (M) ≥ 12 gr/dl (F)

EMATOCRITO (Hct)

volume massa eritrocitaria/volume di plasma

unità di misura = % N = 40-45% (M) 36-42% (F)

INDICI ERITROCITARI

MCV = *volume corpuscolare medio* \longrightarrow $\text{Hct} \times 100 / \text{numero g.r. (prime 2 cifre)}$ N = range 80 – 100 femtolitri (fL)

MCH = *emoglobina corpuscolare media* \longrightarrow $\text{Hb} \times 100 / \text{numero g.r. (prime 2 cifre)}$ N = range 26 - 32 picogrammi (pg)

MCHC = *conc. corpuscolare media di Hb* \longrightarrow $\text{Hb} \times 100 / \text{Hct}$ N = range 31 - 37 g/dL

RDW = *Ampiezza della Distribuzione Eritrocitaria*

\longrightarrow N = range 11,5 - 14,5%



FORMULA LEUCOCITARIA

| | | | | |
|------------|------|---|---------------------------|-------------|
| Neutrofil | 77.7 | H | % | 40.0 - 74.0 |
| Linfociti | 10.9 | L | % | 20.0 - 45.0 |
| Monociti | 9.8 | H | % | 3.40 - 9.00 |
| Eosinofili | 1.6 | | % | 0.00 - 8.00 |
| Basofili | 0.0 | | % | 0.00 - 1.50 |
| Neutrofil | 7.75 | | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 1.50 - 8.00 |
| Linfociti | 1.09 | | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 0.90 - 4.00 |
| Monociti | 0.98 | | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 0.20 - 1.00 |
| Eosinofili | 0.16 | | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 0.00 - 0.80 |
| Basofili | 0.00 | | $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 0.00 - 0.20 |

Formula leucocitaria

Quantità relative, espresse in percentuale, delle varie tipologie di globuli bianchi presenti nel campione

Neutrofil 50-70 %

Linfociti 20-30 % (fino al 40 % sono ancora normali)

Monociti 6-8 %

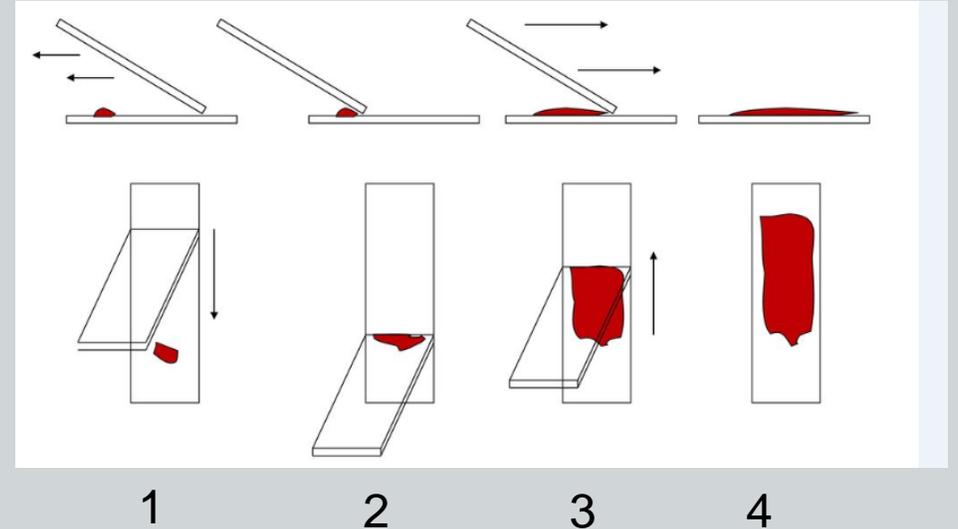
Eosinofili 2-4 % (fino al 5 % sono ancora normali)

Basofili 0,5 -1 %

Esame morfologico del sangue periferico

ESECUZIONE DELLO STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO

COSA SI VALUTA: numero, morfologia, stadio di maturazione e percentuali numeriche di globuli rossi, leucociti e piastrine



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 **colorazione** e **analisi microscopica**

Esame morfologico del sangue periferico

COLORAZIONE DELLO STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO:
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 PRIMARIA:

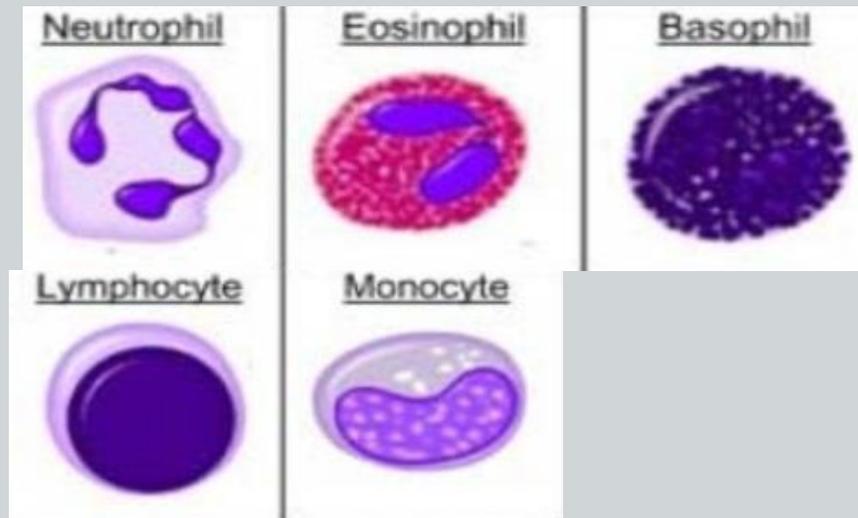
- 1) May-Grunwald puro su tutta la superficie e attendere per 2 minuti
- 2) aggiunta di H₂O (1:2) per 2 minuti e poi scolo

COLORAZIONE SECONDARIA:

- 1) Giemsa 1:10 con H₂O per 10 minuti
- 2) Lavare con H₂O e lasciare asciugare

Esame morfologico del sangue periferico

COLORAZIONE DELLO STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO:
May-Grunwald-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

ANALISI MICROSCOPICA DELLO STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO: MICROSCOPIO OTTICO

ERITROCITI: rosso chiaro/grigio

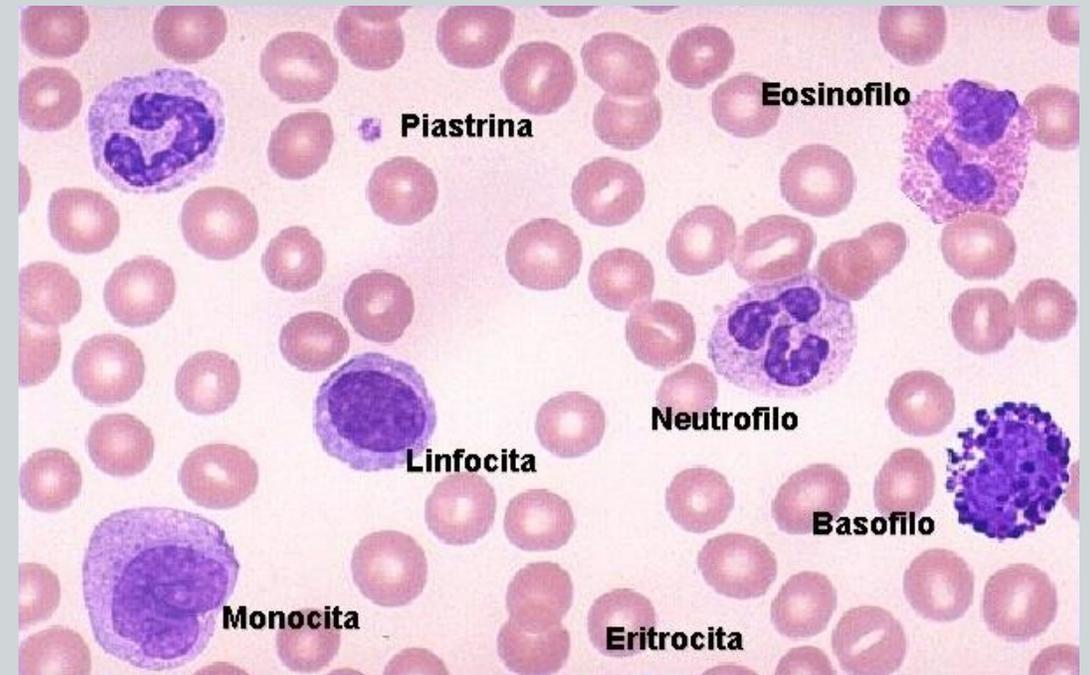
NEUTROFILI: nucleo blu/viola

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 DELLO STRISCIO DI SANGUE PERIFERICO: MICROSCOPIO OTTICO

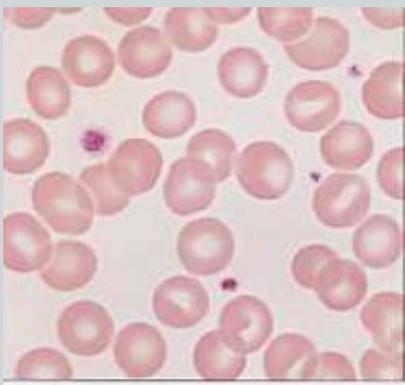
PICCOLO INGRANDIMENTO: adeguatezza del preparato

identifico area di analisi

MEDIO INGRANDIMENTO: analisi morfologica dei leucociti ed eritrociti

MAGGIORE INGRANDIMENTO: dettagli citologici quali

- citoplasma
- nucleo
- granulazioni

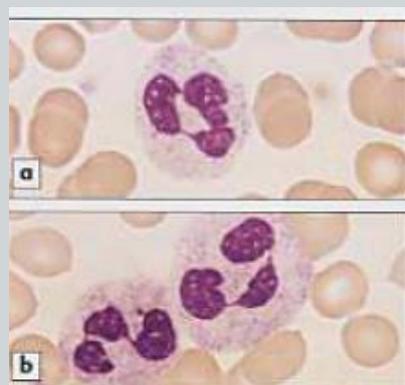


ERITROCITI:

mediamente 8 μm
con area centrale
ipocromatica.

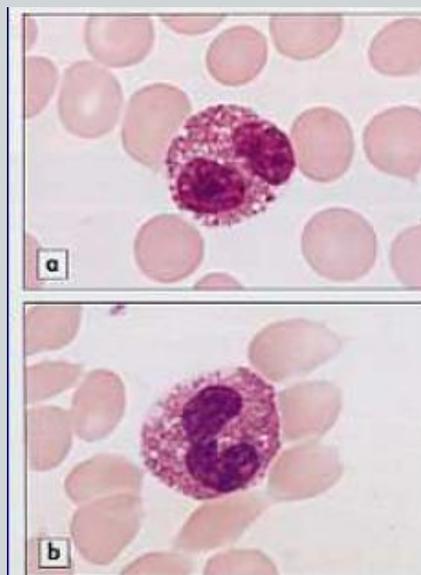
PIASTRINE:

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



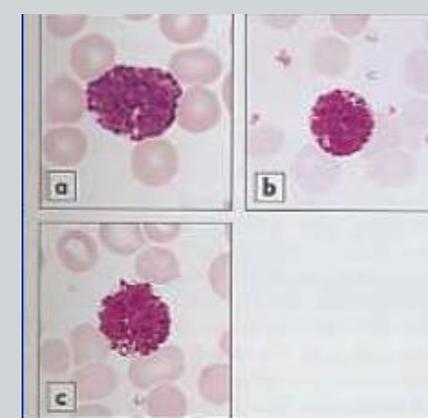
NEUTROFILI:

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.



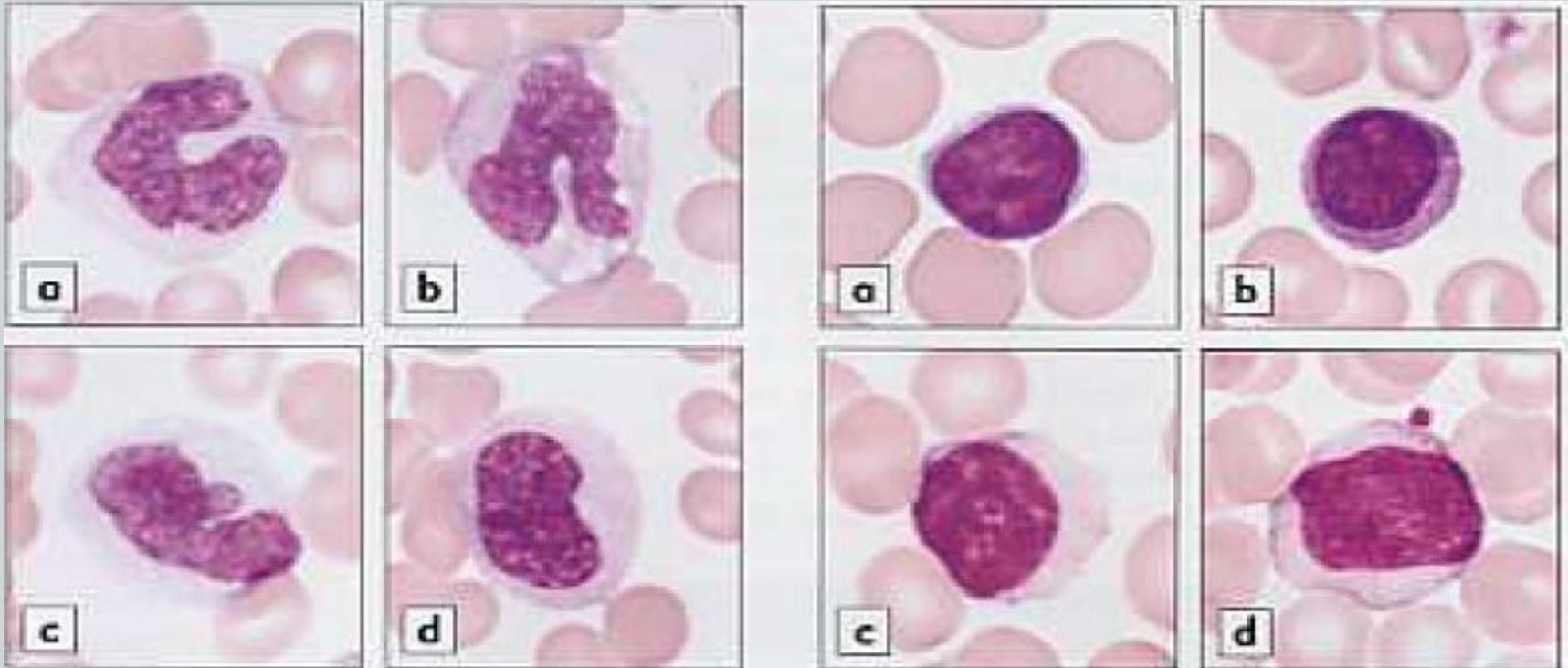
EOSINOFILI:

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.



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 grigiastra con effetto-vetro e granuli azurofili.

Quando infiltrano i tessuti diventano macrofagi e fagocitano cellule senescenti e detriti.

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

1) BIOPSIA MIDOLLARE (AGOASPIRATO MIDOLLARE) → ESAME **CITOLOGICO**

2) BIOPSIA OSSEA → ESAME **ISTOLOGICO**

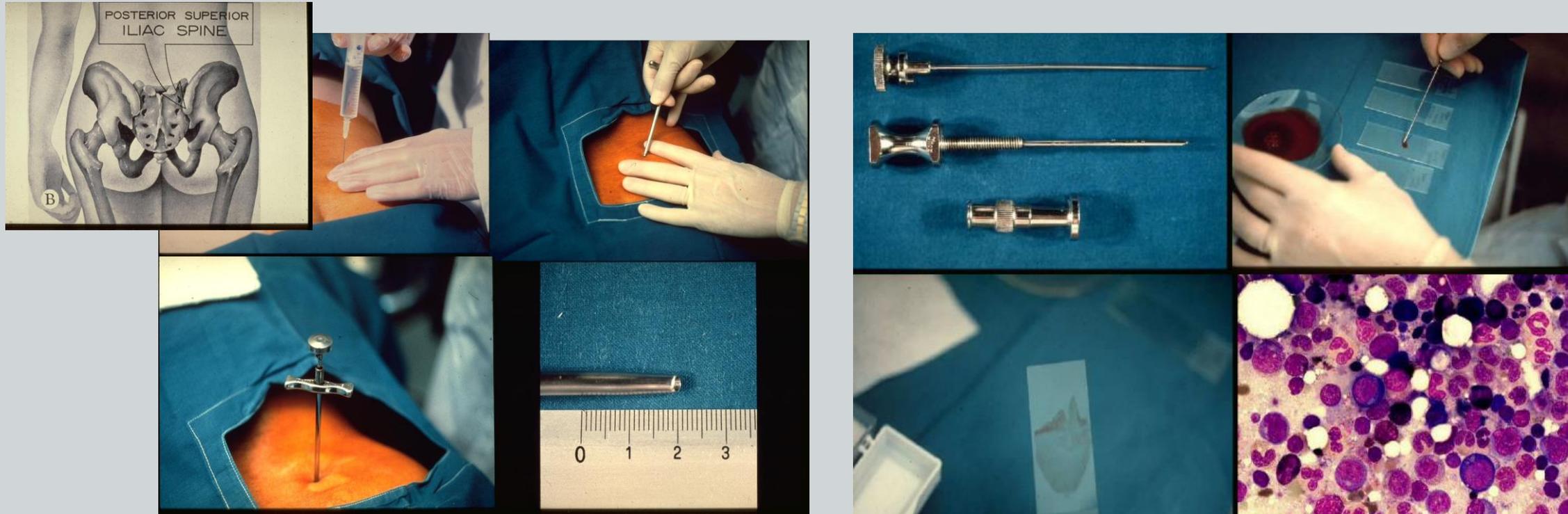
Esame morfologico del sangue midollare

INDICAZIONI ALLA BIOPSIA MIDOLLARE (o AGOASPIRATO MIDOLLARE) - valutazione morfologica, citochimica e fenotipica delle cellule

- LEUCOCITOSI e/o LEUCOPENIA con o senza ANEMIA E PIASTRINOPENIA (LA, MDS, aplasia)
- STADIAZIONE O ESORDIO DI MALATTIA LINFOPROLIFERATIVA
- ANEMIA MACROCITICA O NORMOCITICA
- ALTERAZIONI DELLE Ig (componente monoclonale)
- ALCUNE INFEZIONI (malaria, TBC, Leishmania)

Esame morfologico del sangue midollare

BIOPSIA 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*
- SINDROMI MIELO O LINFOPROLIFERATIVE CRONICHE
- ALTERAZIONI DELLE Ig (componente monoclonale)*
- SOSPETTA INFILTRAZIONE DA NEOPLASIE SOLIDE

* complementare alla biopsia midollare

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.



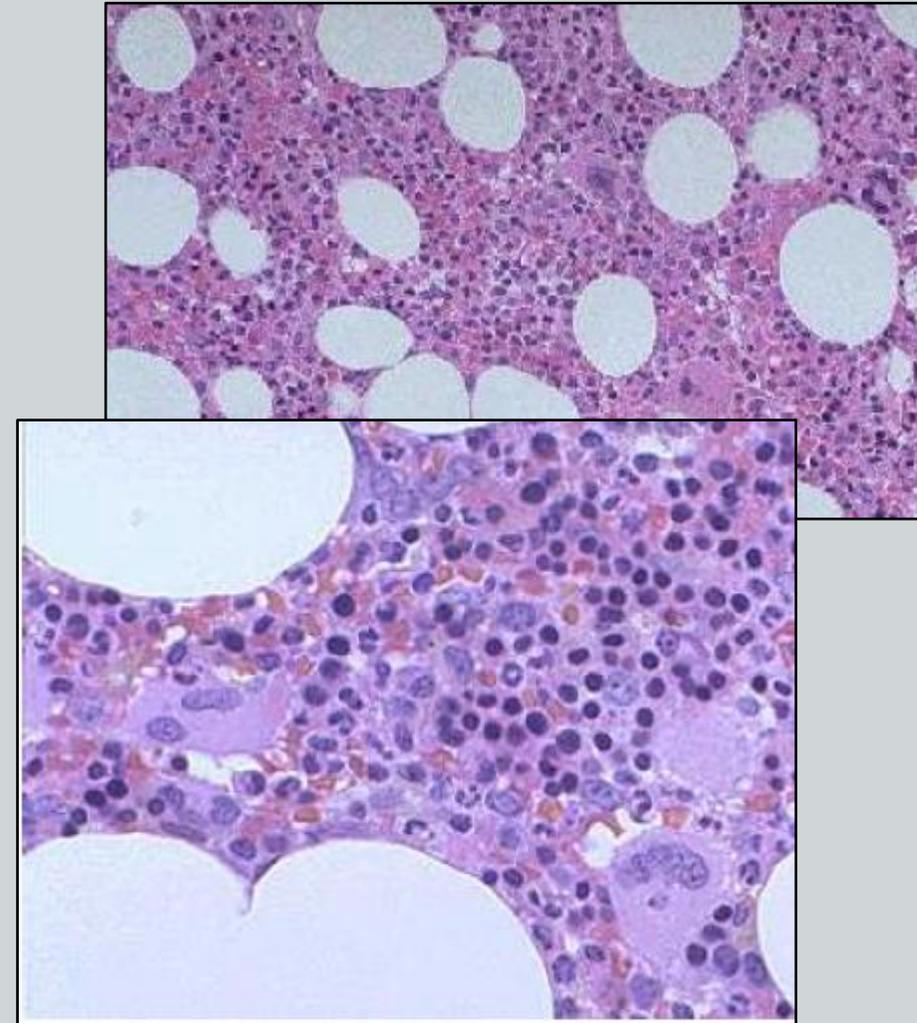
Esame morfologico del sangue midollare

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

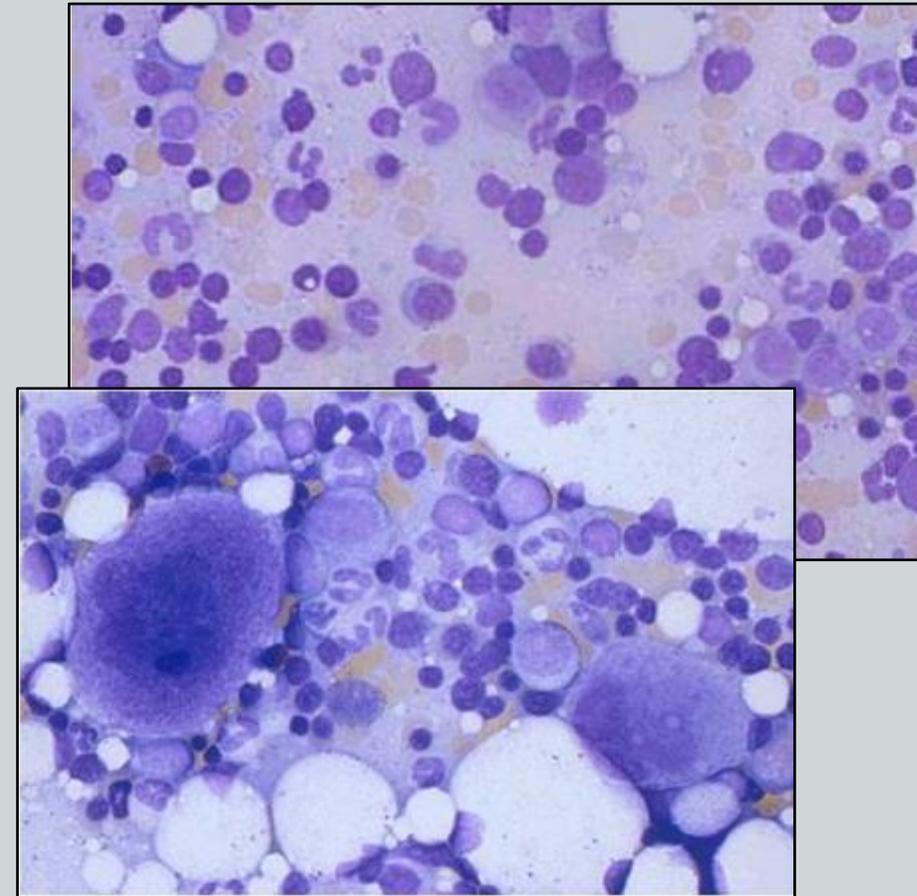


Esame morfologico del sangue midollare

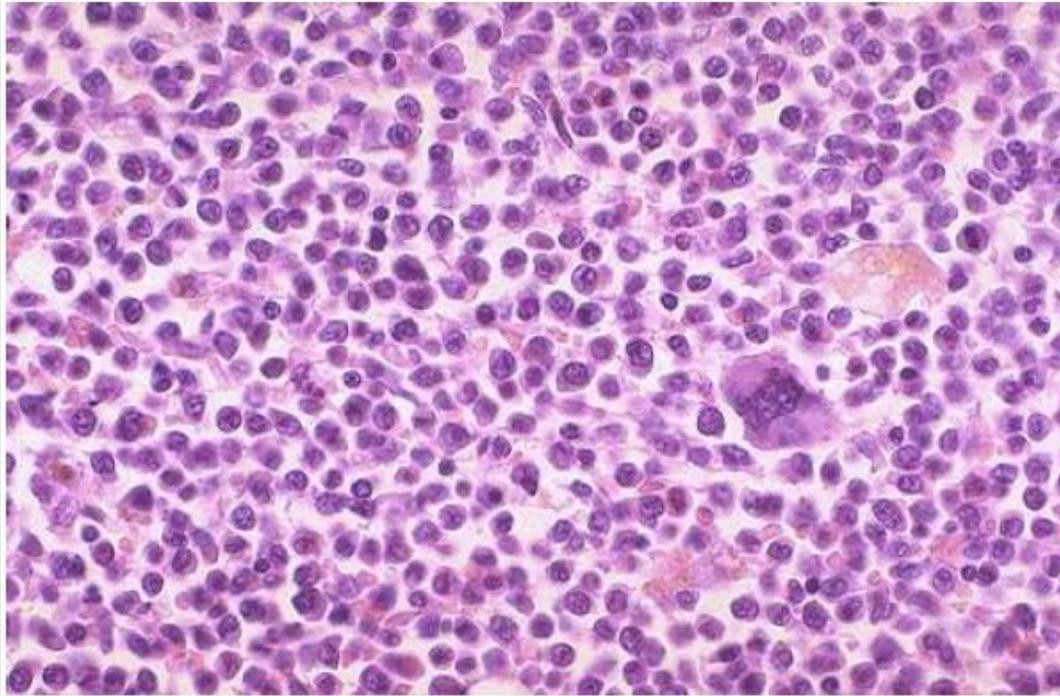
MIDOLLO OSSEO NORMALE: citologia

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

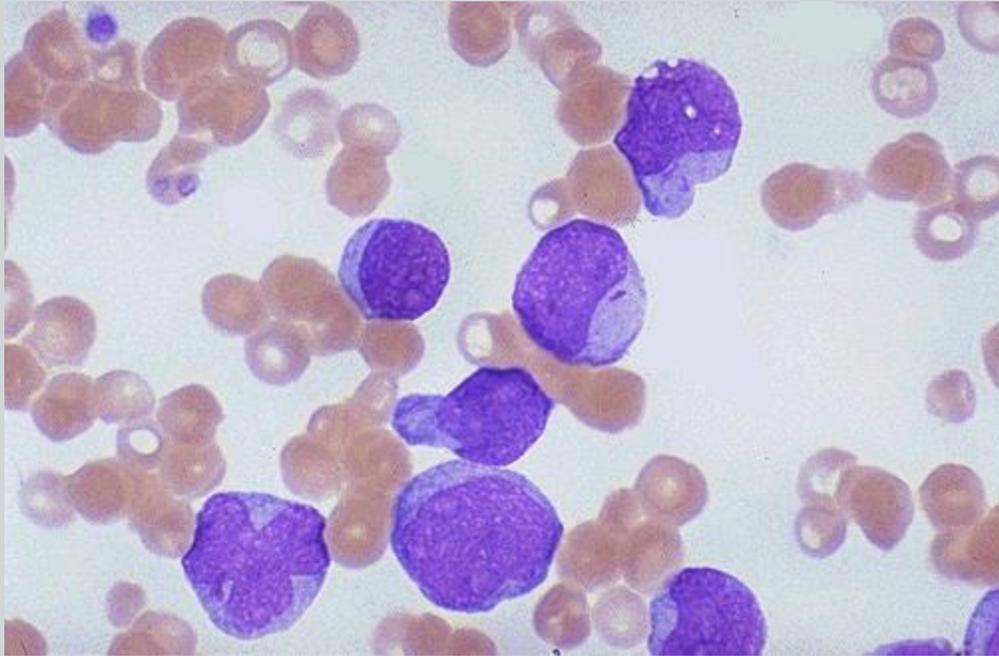


Midollo osseo a forte ingrandimento, in un caso di leucemia acuta mieloide.

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

Si osserva un megacariocito

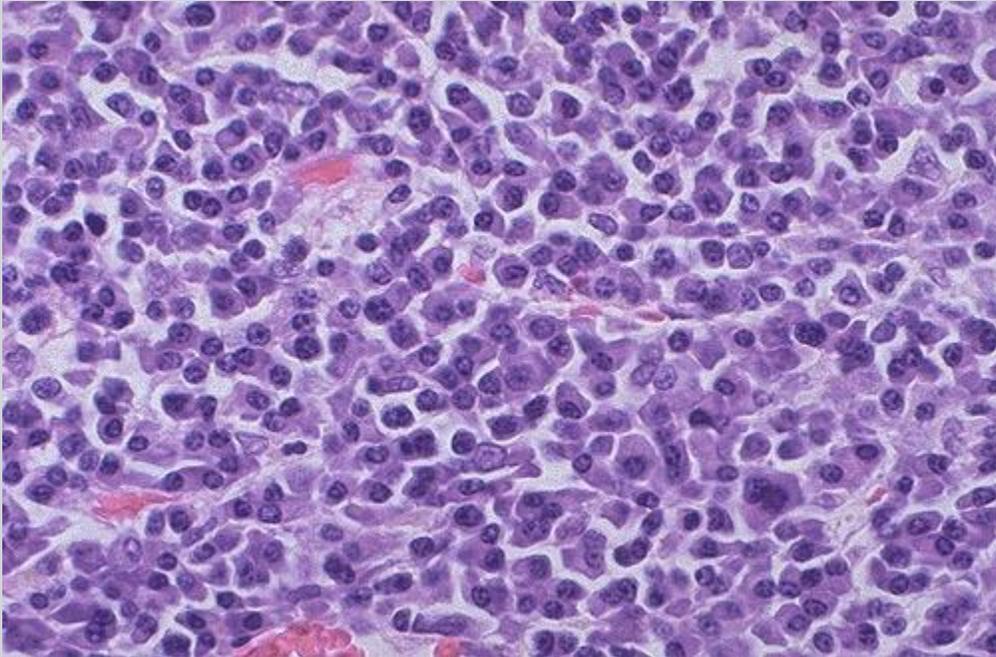
LEUCEMIA ACUTA MIELOIDE (CITOLOGIA)



Sangue midollare a forte ingrandimento, in un caso di leucemia acuta mieloide.

Si osserva un tipico “bastoncello di Auer”

MIELOMA MULTIPLO (ISTOLOGIA)

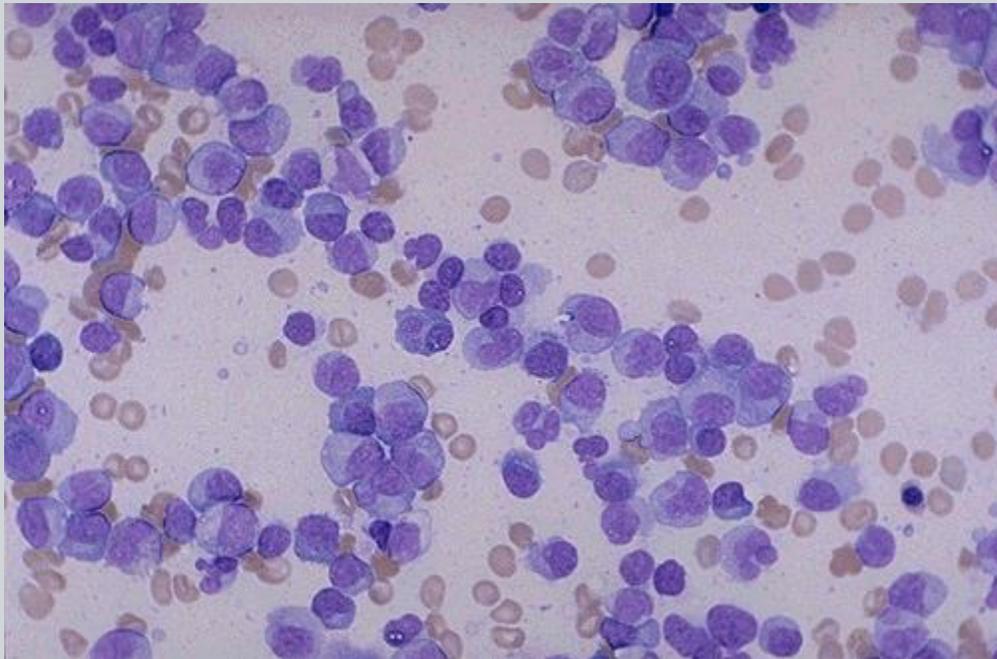


Midollo osseo a medio ingrandimento, in un caso di mieloma multiplo.

La popolazione cellulare è costituita in prevalenza da plasmacellule, simili a quelle normali e solitamente in grado di produrre immunoglobuline.

Come conseguenza, il paziente presenta una *componente monoclonale* sierica e/o urinaria.

MIELOMA MULTIPLO (CITOLOGIA)



Midollo osseo a medio ingrandimento, in un caso di mieloma multiplo.

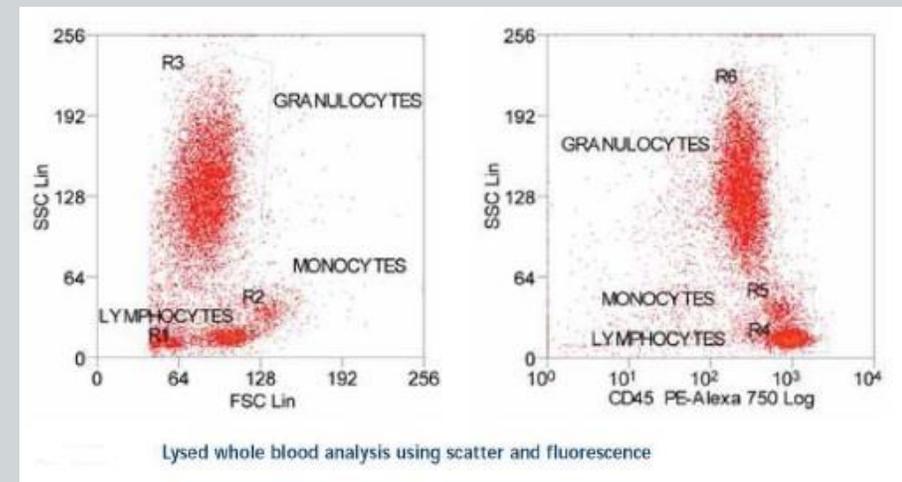
Si osservano numerose plasmacellule.

Analisi Immunofenotipica: citofluorimetria

- ❑ Metodica di laboratorio che permette un'analisi automatica di *suspensioni cellulari monodisperse* misurando le *caratteristiche citologiche e/o biochimiche* all'interno di un flusso laminare che interseca una sorgente luminosa, acquisendo e memorizzando più parametri (*volume, granulosità, fluorescenza*) per ogni cellula acquisita

APPLICAZIONI IN DIAGNOSTICA EMATOLOGICA

- PRESENZA DI CELLULE ATIPICHE/BLASTI
- QUANTIZZAZIONE DELLA POPOLAZIONE PATOLOGICA/QUOTA RESIDUA NORMALE
- RICERCA DI FORME A CARATTERE PROGNOSTICO FAVOREVOLE E/O SFAVOREVOLE
- MONITORAGGIO DELL'MRD



Citofluorimetro

COMPONENTI

- **Sistema fluidoico** per il trasporto del campione e la sua focalizzazione idrodinamica
- **Sistema ottico**
 - Sorgenti di eccitazione
 - Circuito di rilevazione
- **Sistema elettronico** per l'acquisizione, l'elaborazione e la rappresentazione dei dati



Citofluorimetro

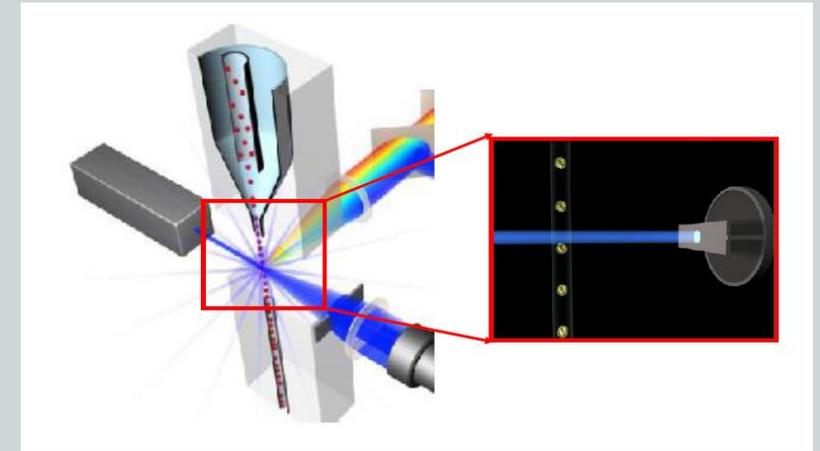
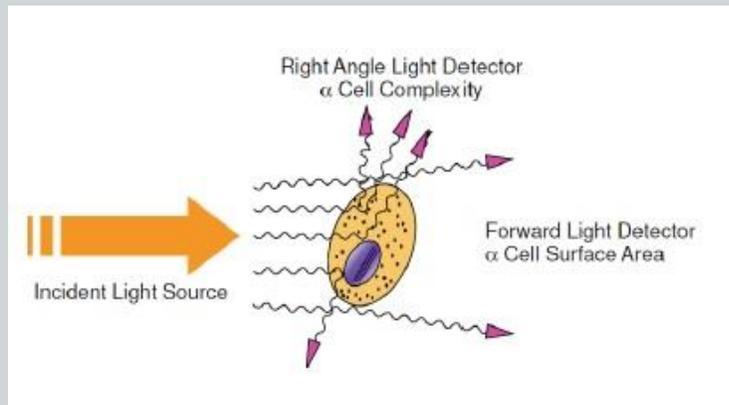
SISTEMA FLUIDICO: CAMERA DI FLUSSO

FOCALIZZAZIONE IDRODINAMICA

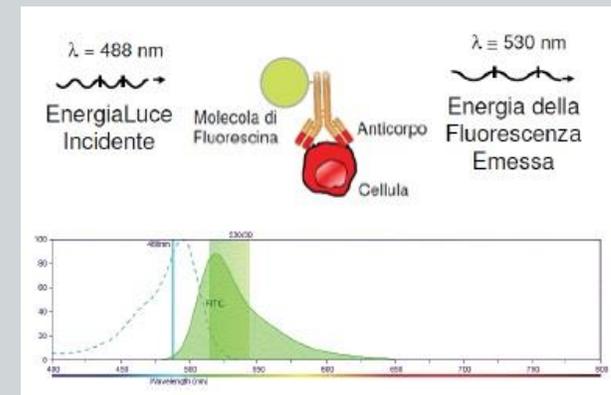
Le cellule vengono iniettate in una camera di flusso diluite ed allineate attraverso un sistema fluidico che interseca il raggio luminoso di una sorgente di eccitazione

L'interazione di un fascio di luce dà luogo a fenomeni di:

LIGHT SCATTERING: volume e granulosità cellulare



FLUORESCENZA: riconoscimento antigeni

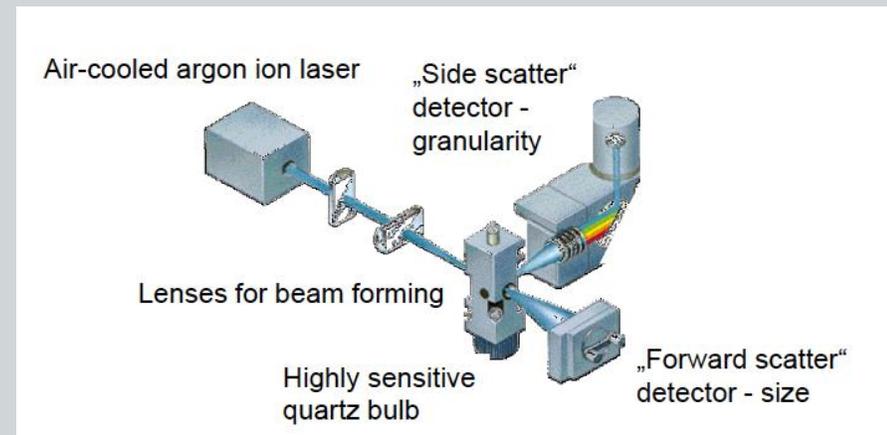


Citofluorimetro

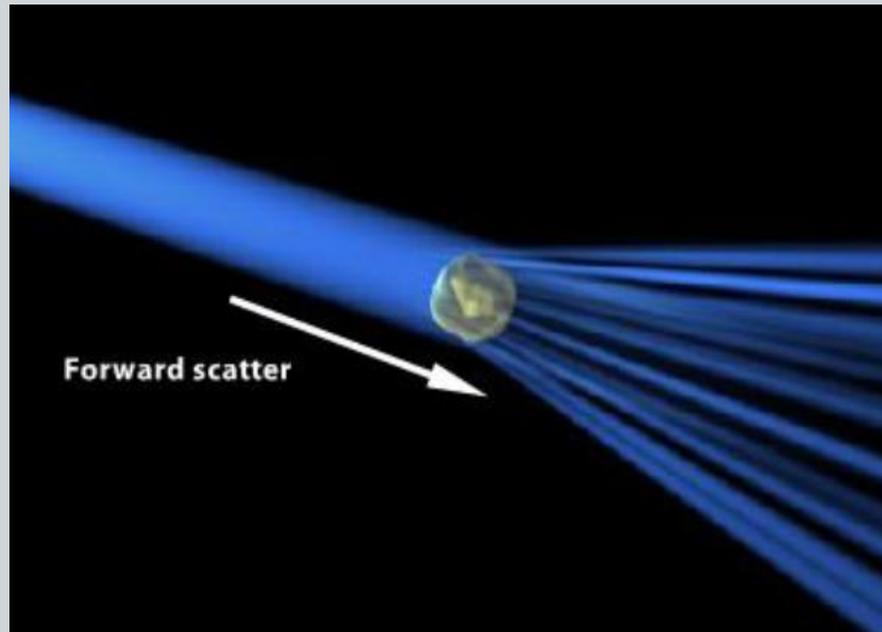
SISTEMA OTTICO ED ELETTRONICO

- sistema di lenti, specchi e filtri ottici raccoglie i segnali
- Invio dei segnali ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicatori) che ne misurano l'intensità
- Invio e analisi dei segnali elettrici, opportunamente amplificati e digitalizzati, provenienti da ogni sensore ad un analizzatore di dati che provvede alla loro visualizzazione su monitor, rappresentazione grafica, e definizione statistica

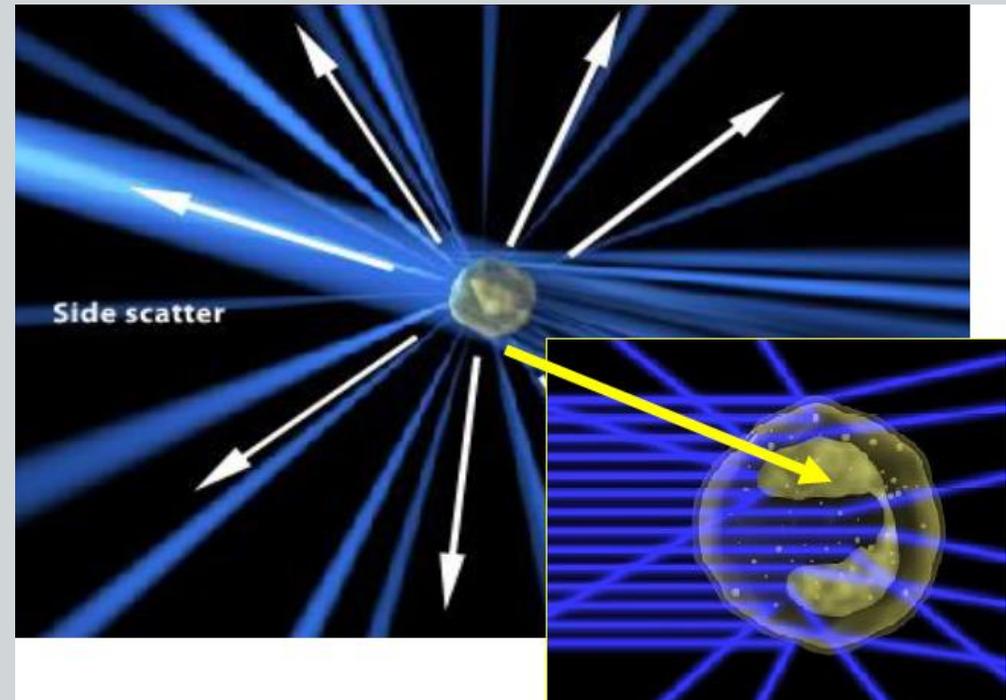
Citofluorimetro: light scattering



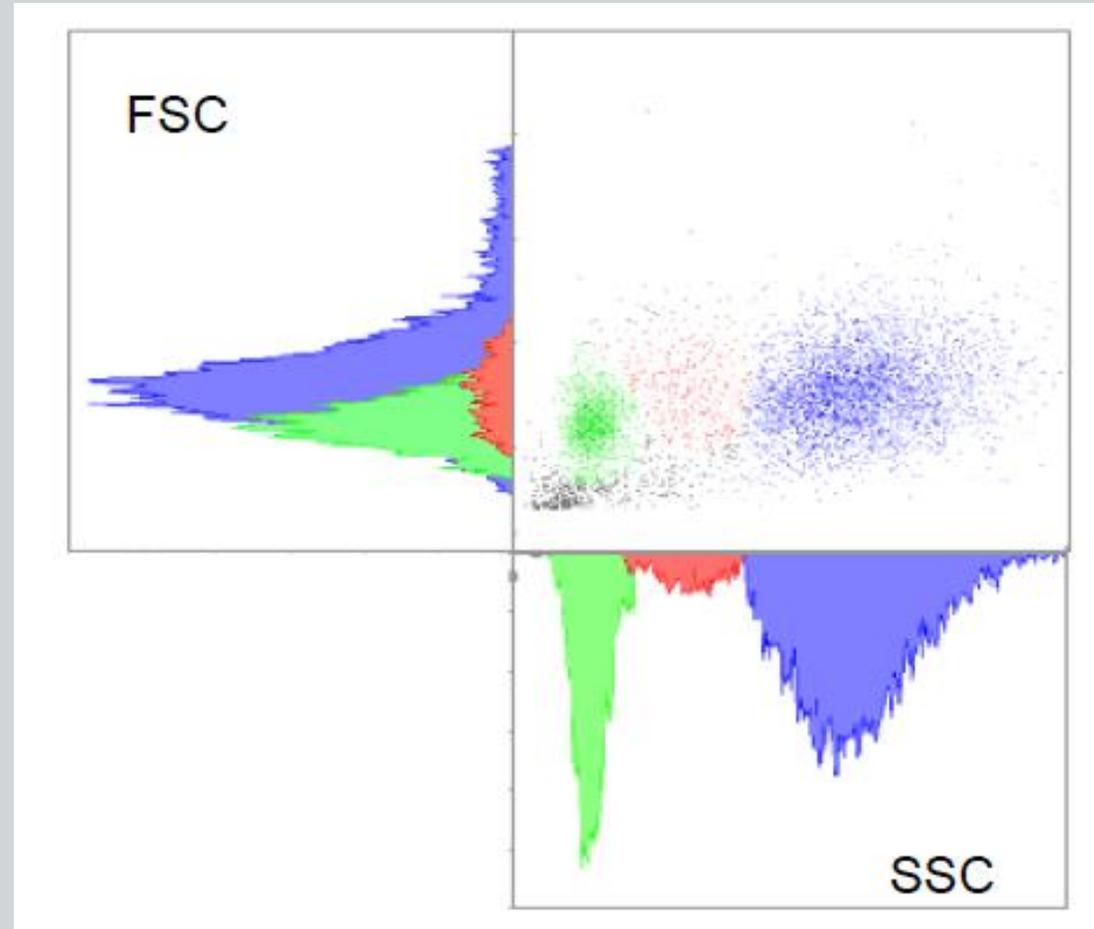
DIMENSIONE



COMPLESSITA'

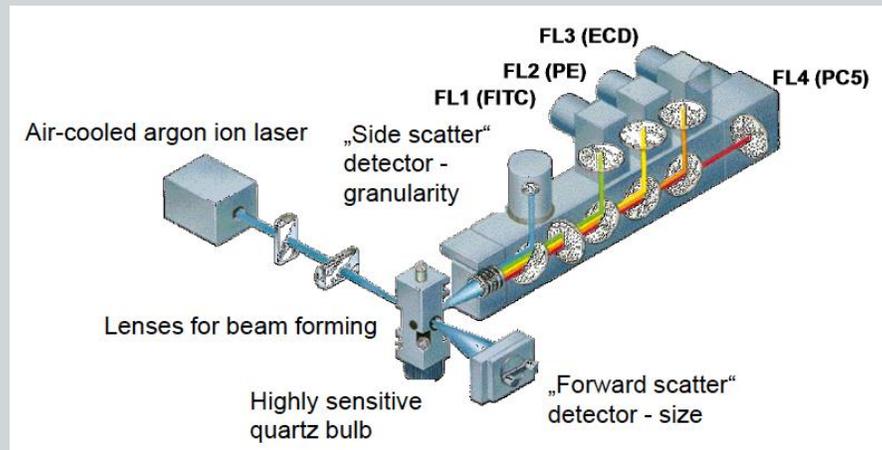


Citofluorimetro: citogramma



Citofluorimetro: la fluorescenza

- antigeni specifici di linea sulla membrana/intracitoplasmatici/endo-nucleari marcati con anticorpi monoclonali legati a fluorocromi



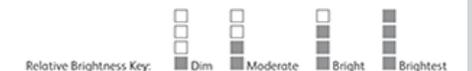
Fluorocromo: caratteristica lunghezza d'onda per l'eccitazione e l'emissione.

| Excitation Laser Line | Channel | Recommended Filter | Fluorochrome | Ex-Max (nm) | Em-Max (nm) | Relative Brightness |
|-----------------------|---------|---------------------|-----------------------|-------------|-------------|---------------------|
| UV | 1 | 379/28 | BD Horizon™ BUV395 | 348 | 395 | ■□□□ |
| | 2 | 515/30 | BD Horizon™ BUV496 | 348 | 496 | ■□□□ |
| | 3 | 585/15 | BD Horizon™ BUV563 | 348 | 563 | ■□□□ |
| | 4 | • | BD Horizon™ BUV615-P | 349 | 616 | ■□□□ |
| | 5 | 670/25 | BD Horizon™ BUV661 | 348 | 661 | ■□□□ |
| | 6 | 740/35 | BD Horizon™ BUV737 | 348 | 737 | ■□□□ |
| | 7 | 820/60 | BD Horizon™ BUV805 | 348 | 805 | ■□□□ |
| Violet | 8 | 450/40 | BD Horizon™ BV421 | 407 | 421 | ■□□□ |
| | | 450/40 | BD Horizon™ V450 | 404 | 448 | ■□□□ |
| | 9 | 450/40 | Pacific Blue™ | 401 | 452 | ■□□□ |
| | | 525/40 | BD Horizon™ BV480 | 436 | 478 | ■□□□ |
| | | 525/50 | BD Horizon™ V500 | 415 | 500 | ■□□□ |
| | | 525/40 | BD Horizon™ BV510 | 405 | 510 | ■□□□ |
| | 10 | • | BD Horizon™ BV570 | 407 | 574 | ■□□□ |
| | 11 | 610/20 | BD Horizon™ BV605 | 407 | 602 | ■□□□ |
| | 12 | 660/20 | BD Horizon™ BV650 | 407 | 650 | ■□□□ |
| | 13 | 710/50 | BD Horizon™ BV711 | 407 | 711 | ■□□□ |
| 14 | • | BD Horizon™ BV750 | 407 | 748 | ■□□□ | |
| 15 | 780/60 | BD Horizon™ BV786 | 407 | 786 | ■□□□ | |
| Blue | 16 | 530/30 | BD Horizon™ BB515 | 490 | 515 | ■□□□ |
| | | 530/30 | Alexa Fluor® 488 | 495 | 519 | ■□□□ |
| | | 530/30 | FITC | 494 | 519 | ■□□□ |
| | 17 | • | BD Horizon™ BB630-P | 484 | 631 | ■□□□ |
| | 18 | • | BD Horizon™ BB660-P | 484 | 667 | ■□□□ |
| | 19 | 695/40 | PerCP** | 482 | 678 | ■□□□ |
| | | 695/40 | PerCP-Cy™5.5** | 482 | 695 | ■□□□ |
| 20 | • | BD Horizon™ BB790-P | 484 | 793 | ■□□□ | |
| Yellow-Green | 21 | • | BD Horizon™ BYG584-P | 563 | 584 | ■□□□ |
| | | 575/26 | PE* | 496 | 578 | ■□□□ |
| | 22 | 610/20 | BD Horizon™ PE-CF594* | 564 | 612 | ■□□□ |
| | 23 | 670/14 | PE-Cy™5* | 564 | 667 | ■□□□ |
| 24 | 780/60 | PE-Cy™7* | 564 | 785 | ■□□□ | |
| Red | 25 | 660/20 | APC | 650 | 660 | ■□□□ |
| | | 660/20 | Alexa Fluor® 647 | 650 | 668 | ■□□□ |
| | 26 | 730/45 | BD Horizon™ APC-R700 | 652 | 704 | ■□□□ |
| | | 730/45 | Alexa Fluor® 700 | 696 | 719 | ■□□□ |
| | 27 | 780/60 | APC-Cy7 | 650 | 785 | ■□□□ |
| | | 780/60 | BD™ APC-H7 | 650 | 785 | ■□□□ |

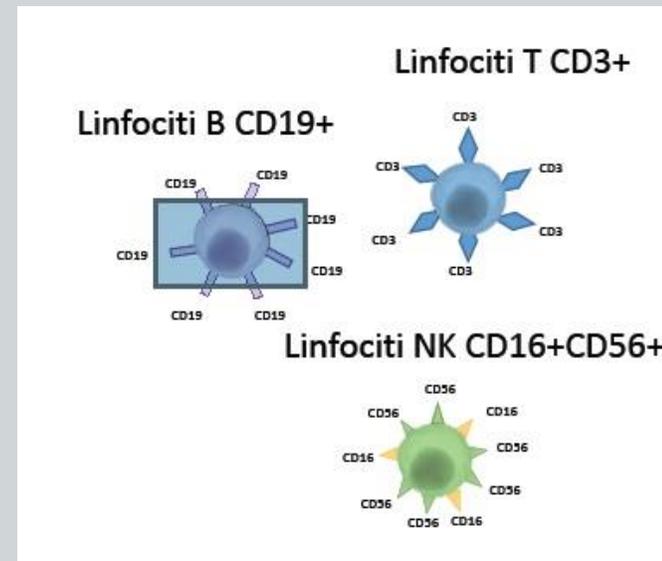
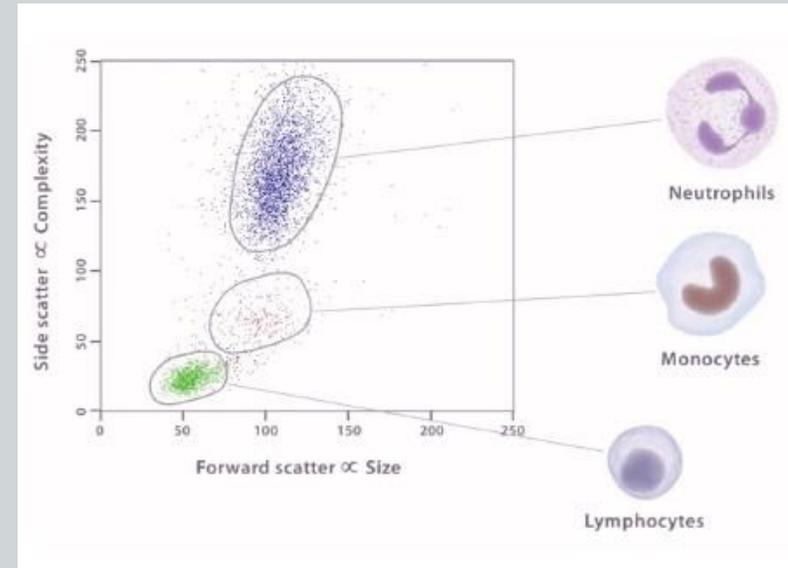
*Filter recommendations will be provided based on instrument configuration

**Excited by 488 nm, 532 nm, and 561 nm

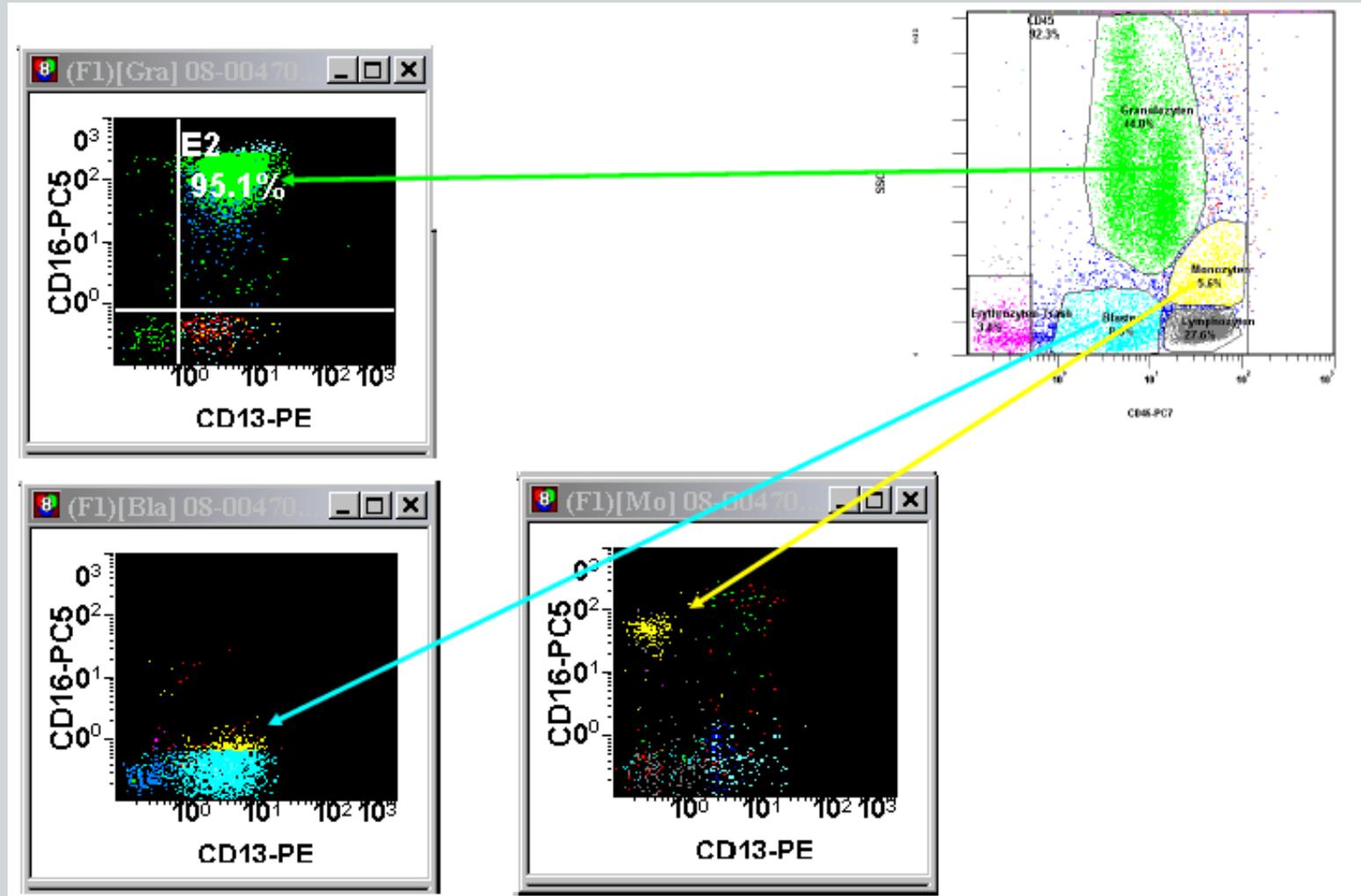
**Excited by 488 nm and 532 nm



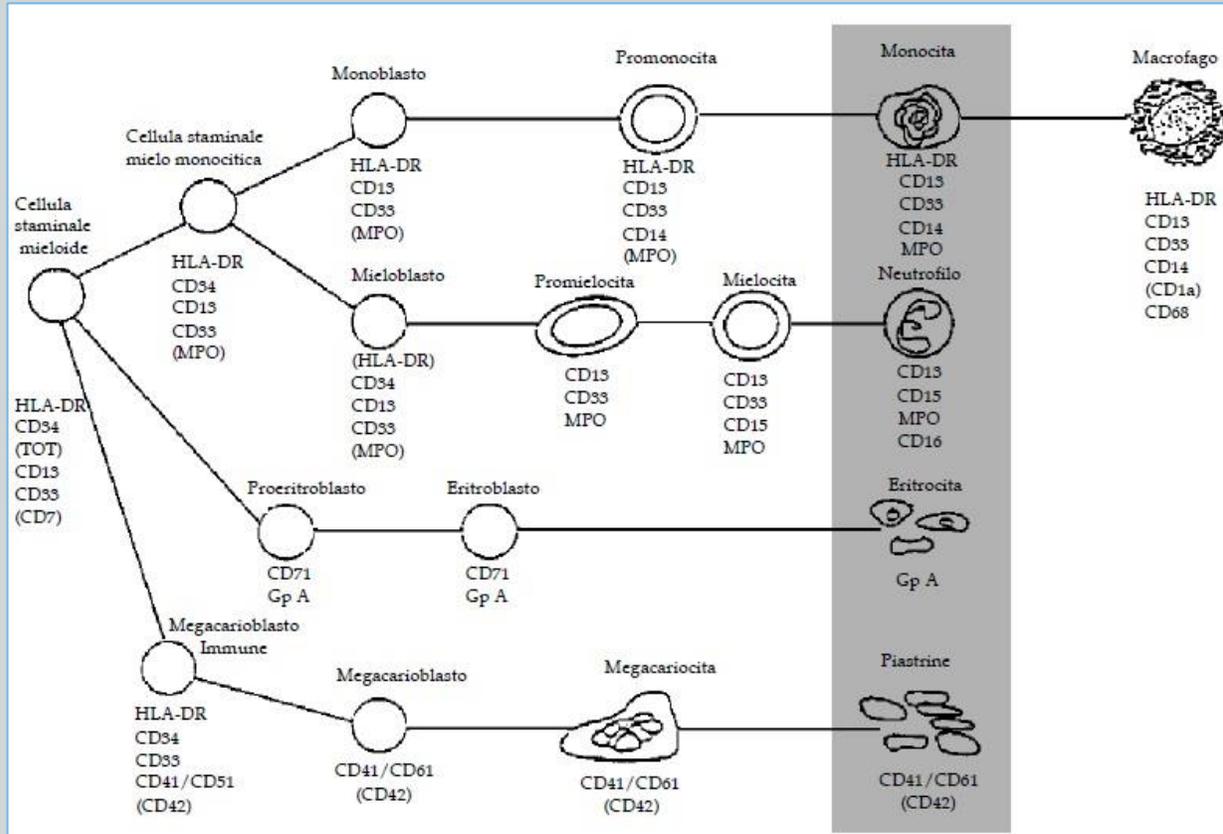
1. Le cellule del sangue mostrano distinti profili di forward e side scatter (LIGHT SCATTERING)
2. Le diverse popolazioni cellulari esprimono sulla propria superficie markers specifici che le discriminano dalle altre (FLUORESCENZA)



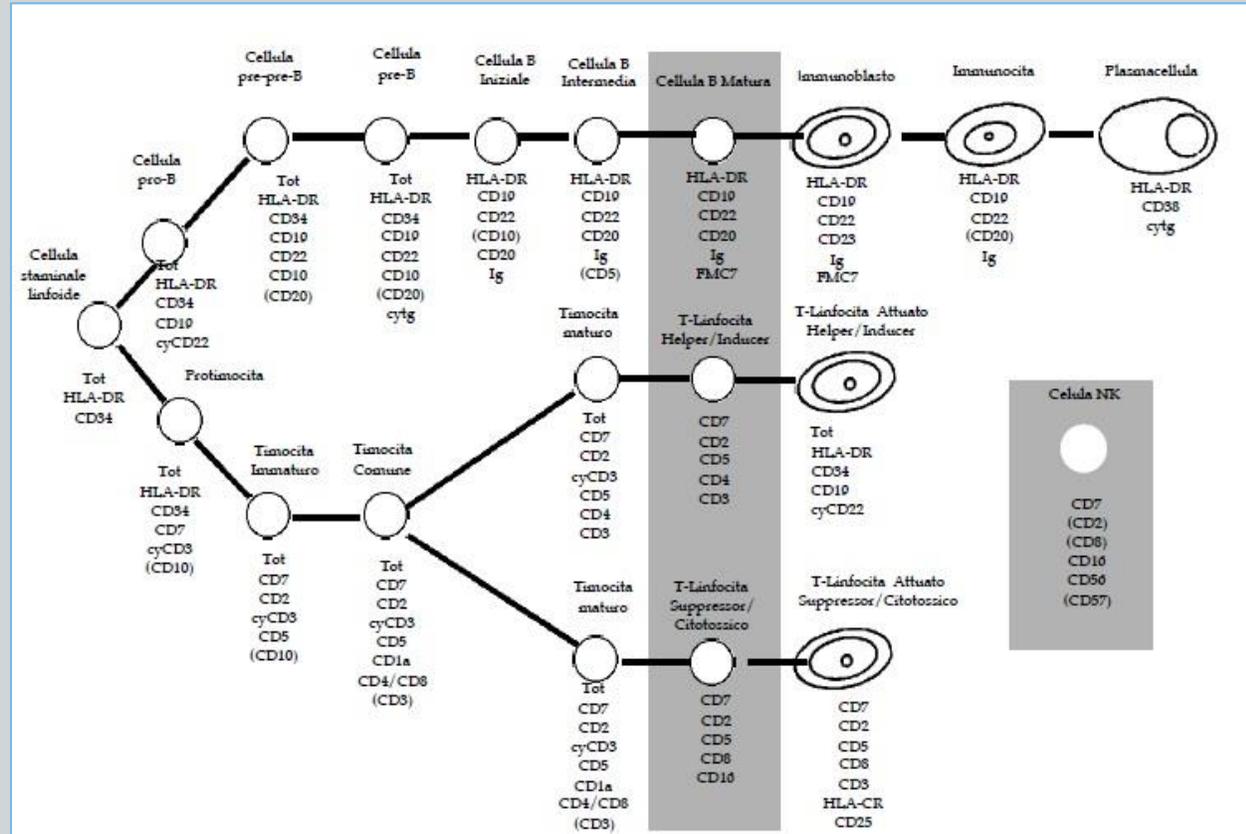
Citofluorimetro: il gating



Immunofenotipi normali



Schema Immunofenotipico nel corso di differenziazione cellulare Mieloide.



Schema Immunofenotipico nel corso di differenziazione cellulare Linfoide.

Immunofenotipi tipici: LAIP

| Antigene | Classificazione FAB | | | | | | |
|----------|---------------------|---------------|----------------|----------------|-----|---------------|-----|
| | MO | M2 I(8;21) | M3 I(15;17) | M4Eo Inv.16 | M5 | M5 I(0;11) | M7 |
| MPO | +/- | + | + | + | -/+ | - | - |
| CD2 | - | | | + | | | |
| CD13 | +/- | + | + | + | + | - | +/- |
| CD14 | - | - | - | +/- | +/- | - | - |
| CD15 | - | + | - | +/- | | + | - |
| CD19 | - | + | | | | | |
| CD33 | +/- | + | + | + | + | + | +/- |
| CD34 | +/- | + | - | -/+ | | | |
| CD56 | | + | | | | | |
| CD61 | - | - | - | - | - | - | + |
| CD64 | - | - | + | + | + | + | |
| CDw65 | +/- | | -/+ | + | + | + | + |
| CD117 | + | +/- | -/+ | + | +/- | | |
| HLA-DR | +/- | + | - | + | + | + | +/- |

-: Antigeni non espressi, -/+: antigeni espressi in meno del 50% dei pazienti, +/- antigeni espressi nella maggior parte dei pazienti, +: antigeni espressi, campi aperti rappresentano l'espressione parziale senza specificità per la diagnosi o la mancanza di dati affidabili.

Diagnosi immunologica di leucemia mieloide acuta

| Antigene | Diagnosi | | | | | | |
|----------|----------|------|------|------|-----|-------|-----|
| | CLL | PLL | HCL | FL | MCL | LP-IL | PCL |
| slg | +/-w | +s | +s | +s | +s | +s | - |
| CD5 | + | -/+w | - | - | + | +/- | - |
| CD10 | - | - | - | +/- | - | - | -/+ |
| CD11c | +/-w | -/+ | +s | - | - | -/+ | - |
| CD19 | + | + | + | + | + | + | - |
| CD20 | + | + | + | + | + | + | - |
| CD23 | + | -/+ | - | -/+ | - | -/+ | - |
| CD38 | - | - | -/+w | -/+w | - | +/- | +s |
| CD103 | - | - | +s | - | - | - | - |
| FMC7 | -/+w | + | + | + | + | -/+ | - |

-: Antigeni non espressi, -/+: antigeni espressi in meno del 50% dei pazienti, +/- antigeni espressi nella maggior parte dei pazienti, +: antigeni espressi, w. debole espressione, s: forte espressione
 FL linfoma follicolare, HCL leucemia a cellule capelute, LGLL linfoma granulare grande, LP-IC immunocitoma linfoplasmocitico, MCL linfoma a cellule del mantello, PCL plasma di cellule della leucemia, PLL leucemia prolinfocitaria

Diagnosi immunologica di malattie linfoproliferative a cellule B

| Antigene | Diagnosi | | | |
|----------|----------|-----------|------|-----|
| | T-PLL | Sézary/MF | LGLL | ATL |
| CD3 | + | + | + | + |
| CD4 | +/- | + | -/+ | + |
| CD5 | + | + | + | + |
| CD7 | + | - | -/+ | -/+ |
| CD8 | -/+ | - | +/- | - |
| CD56 | - | - | +/- | - |
| CD57 | - | - | +/- | - |
| HLA-DR | - | - | - | - |

-: Antigeni non espressi, -/+: antigeni espressi in meno del 50% dei pazienti, +/- antigeni espressi nella maggior parte dei pazienti, ATL leucemia a cellule-T adulte, LGLL leucemia a grandi linfociti granulati, T-PLL leucemia prolinfocitaria.

Diagnosi immunologica di malattie linfoproliferative a cellule T



L'INNOVAZIONE: NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

NGS

Obiettivi

- Identificare nuovi **marcatori tumor-related**
- Identificare nuovi **marker prognostici**
- Conoscere meglio la biologia dei tumori (pathway implicate nella tumorigenesi e progressione)
- Identificare **nuovi target terapeutici**

Vantaggi

- Ridotta quantità di DNA di partenza
- Ciascuna sequenza deriva da un'unica molecola di DNA di partenza
- Possibilità di studiare: mutazioni, geni di fusione, metilazione, aplotipi
- Diminuzione del tempo e del costo

Svantaggi

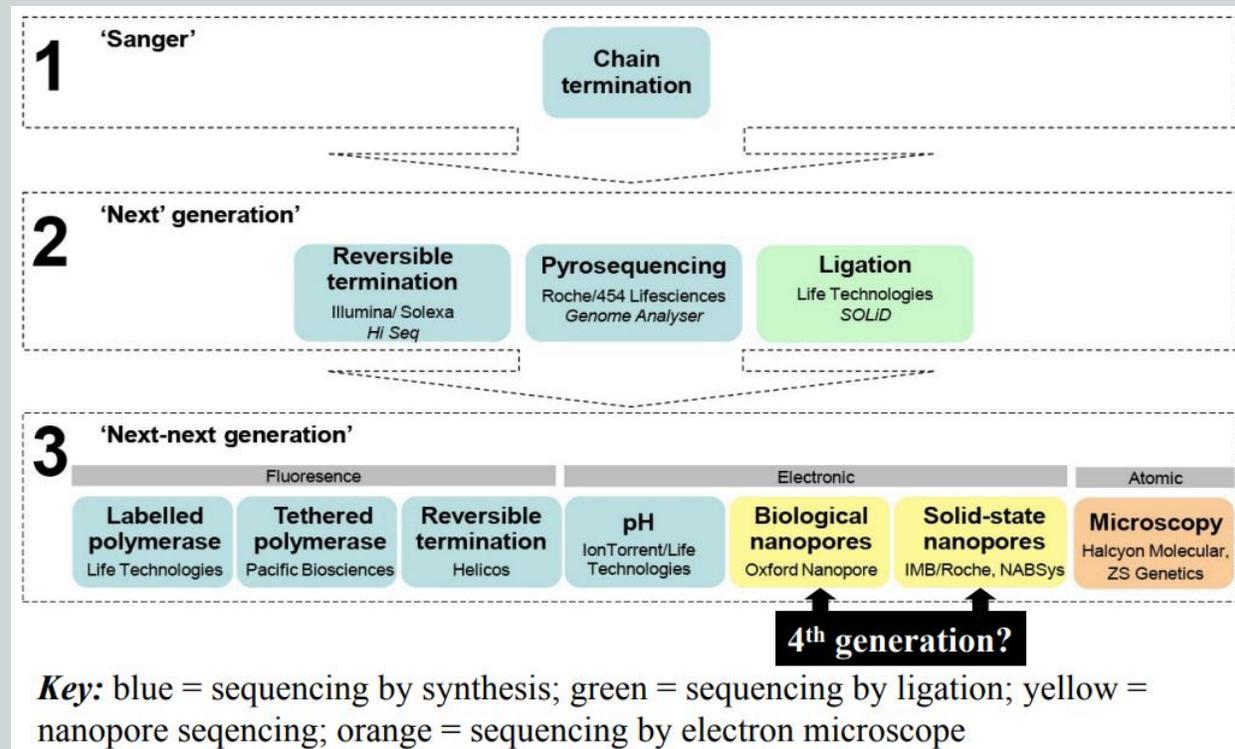
- Sono prodotte sequenze più corte rispetto ai sequenziatori capillari (metodo Sanger)
- Enorme difficoltà nell'analisi dei dati; richiesto un grande sforzo di programmazione per costruire nuovi algoritmi
- La mole enorme di dati 'traumatizza' le infrastrutture informatiche

COS'È NEXT?

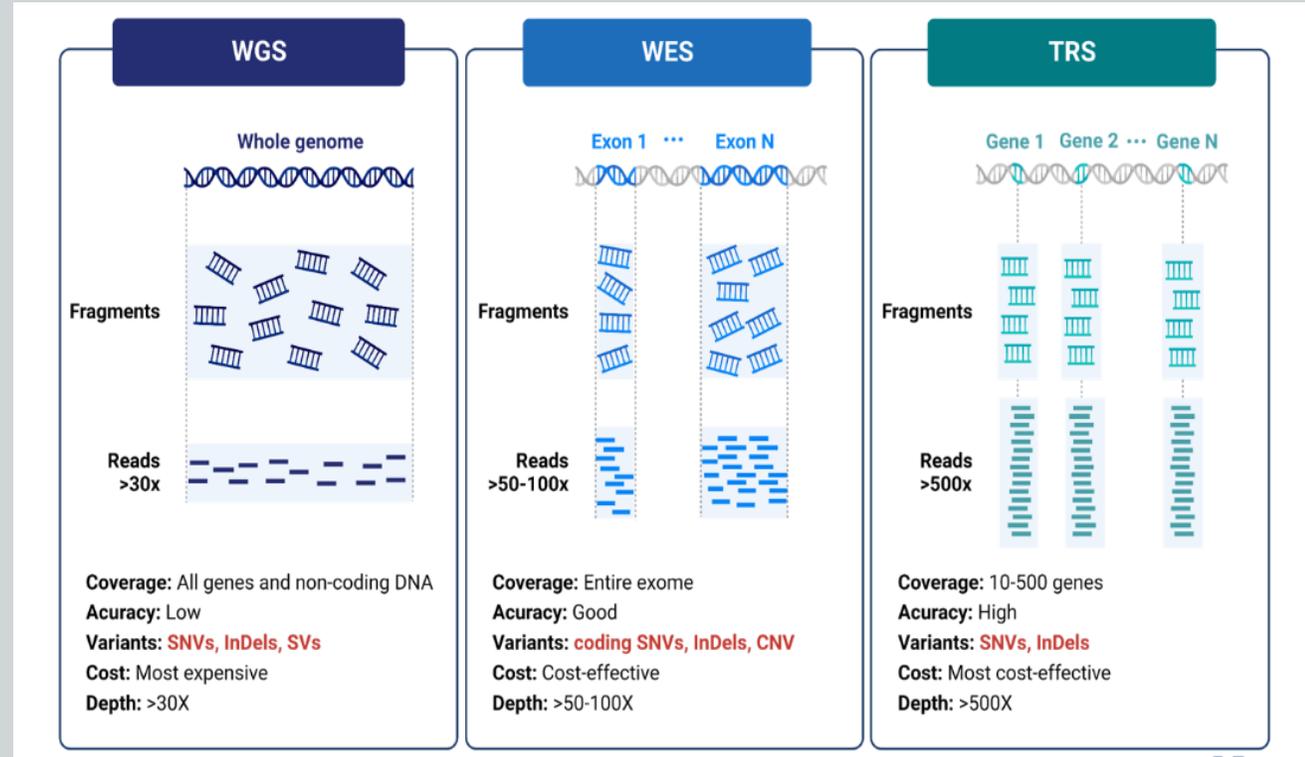
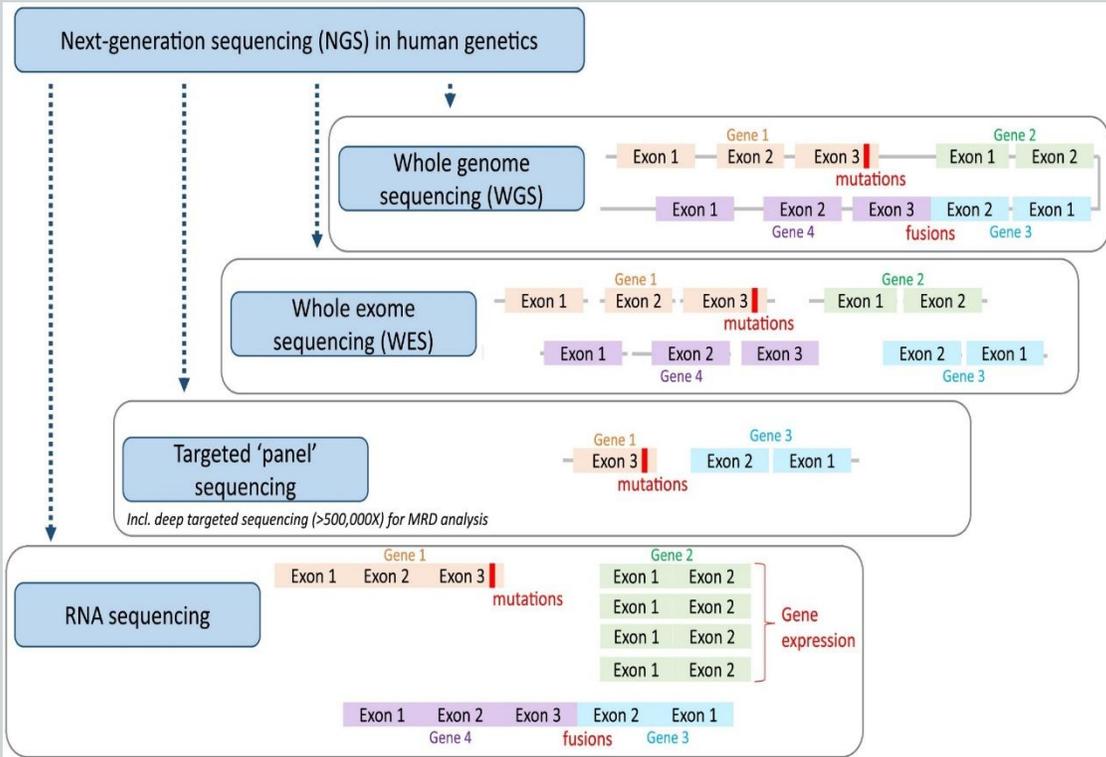
Sequenziamento di cluster clonali

Le tecniche NGS si basano sul principio del sequenziamento di 'cluster' clonali

Il processo inizia con una singola molecola target e prevede la creazione di targets clonali durante uno step intermedio di amplificazione.

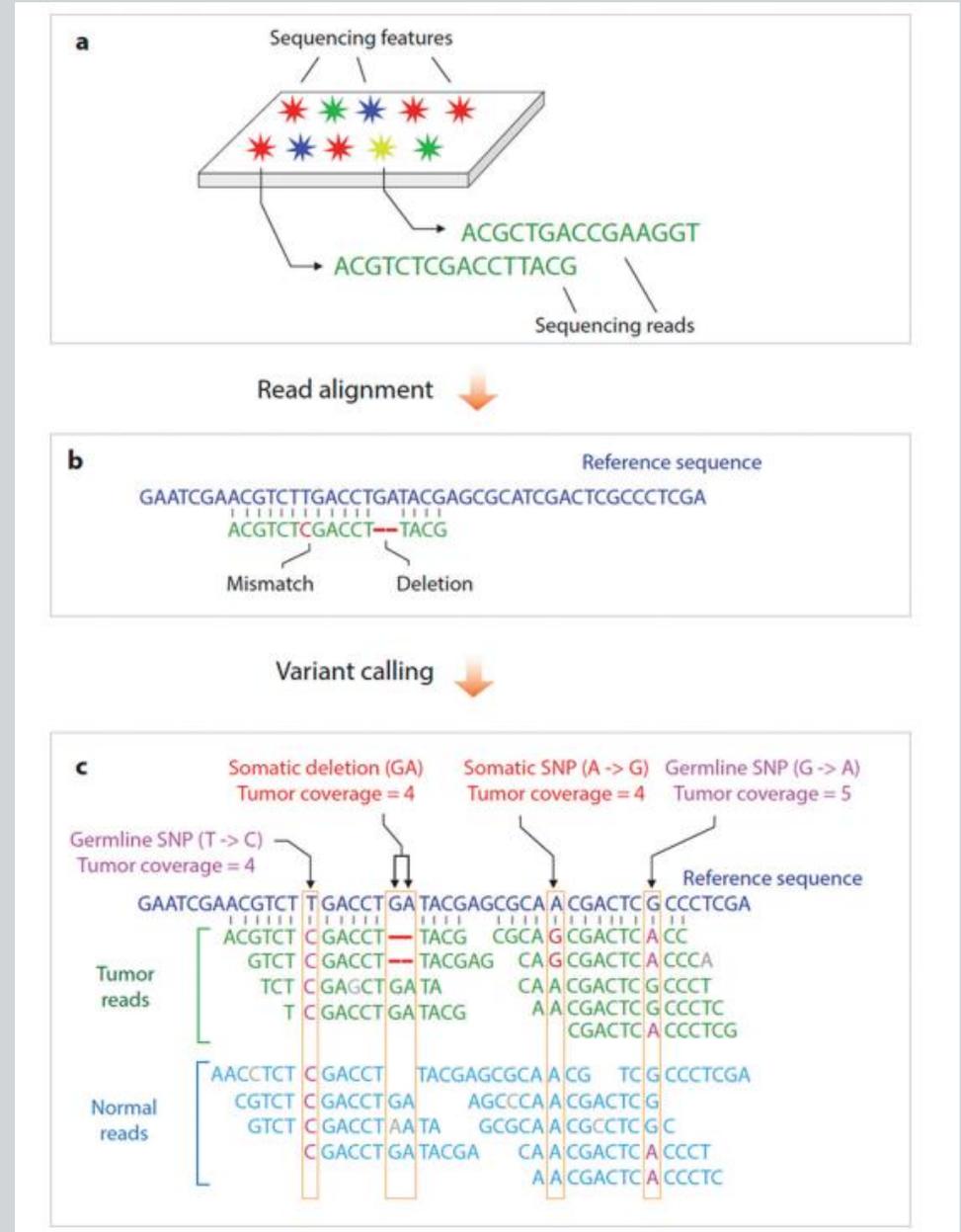


NGS: APPLICAZIONI

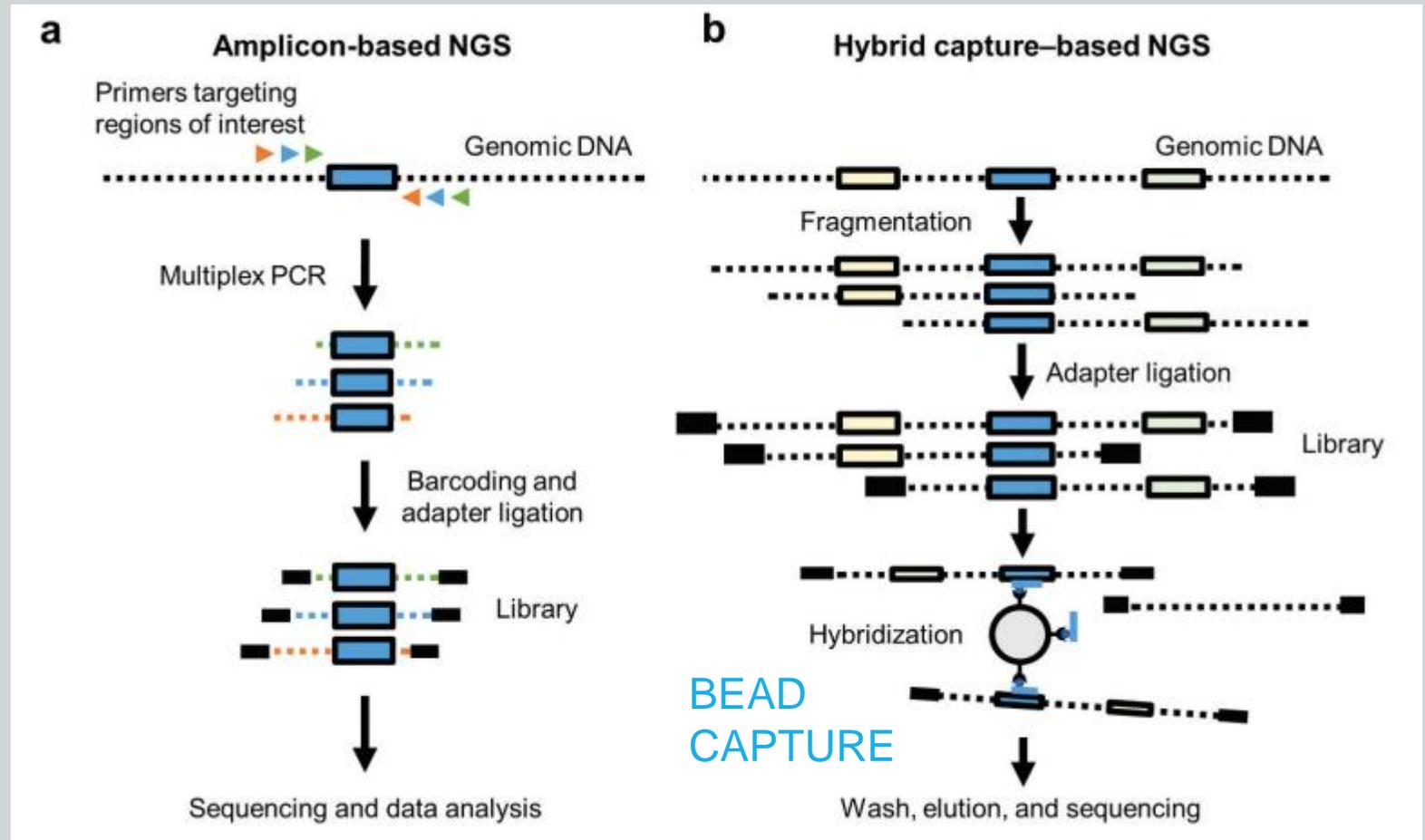
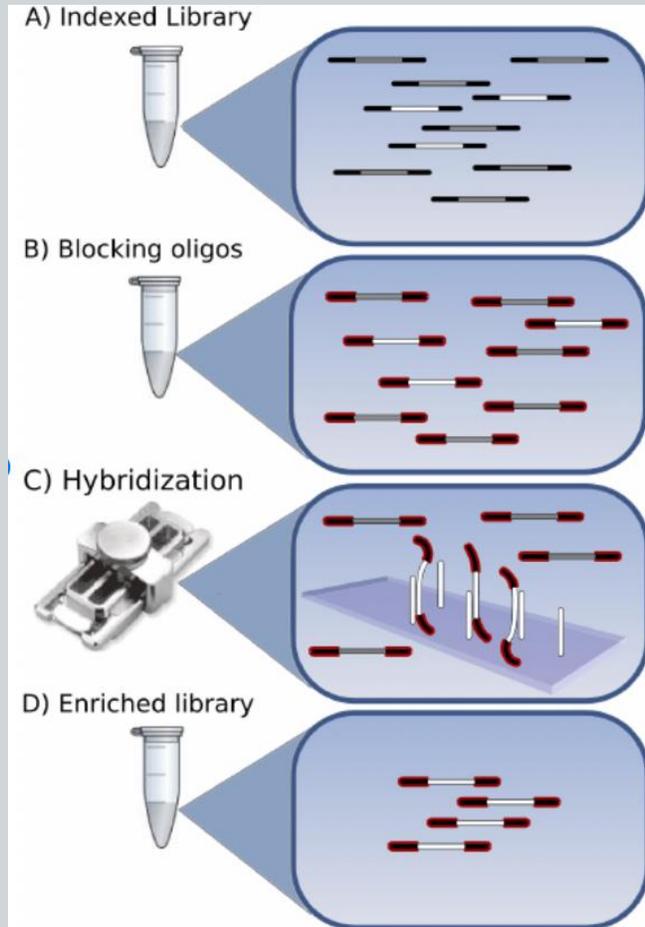


NGS: WORKFLOW

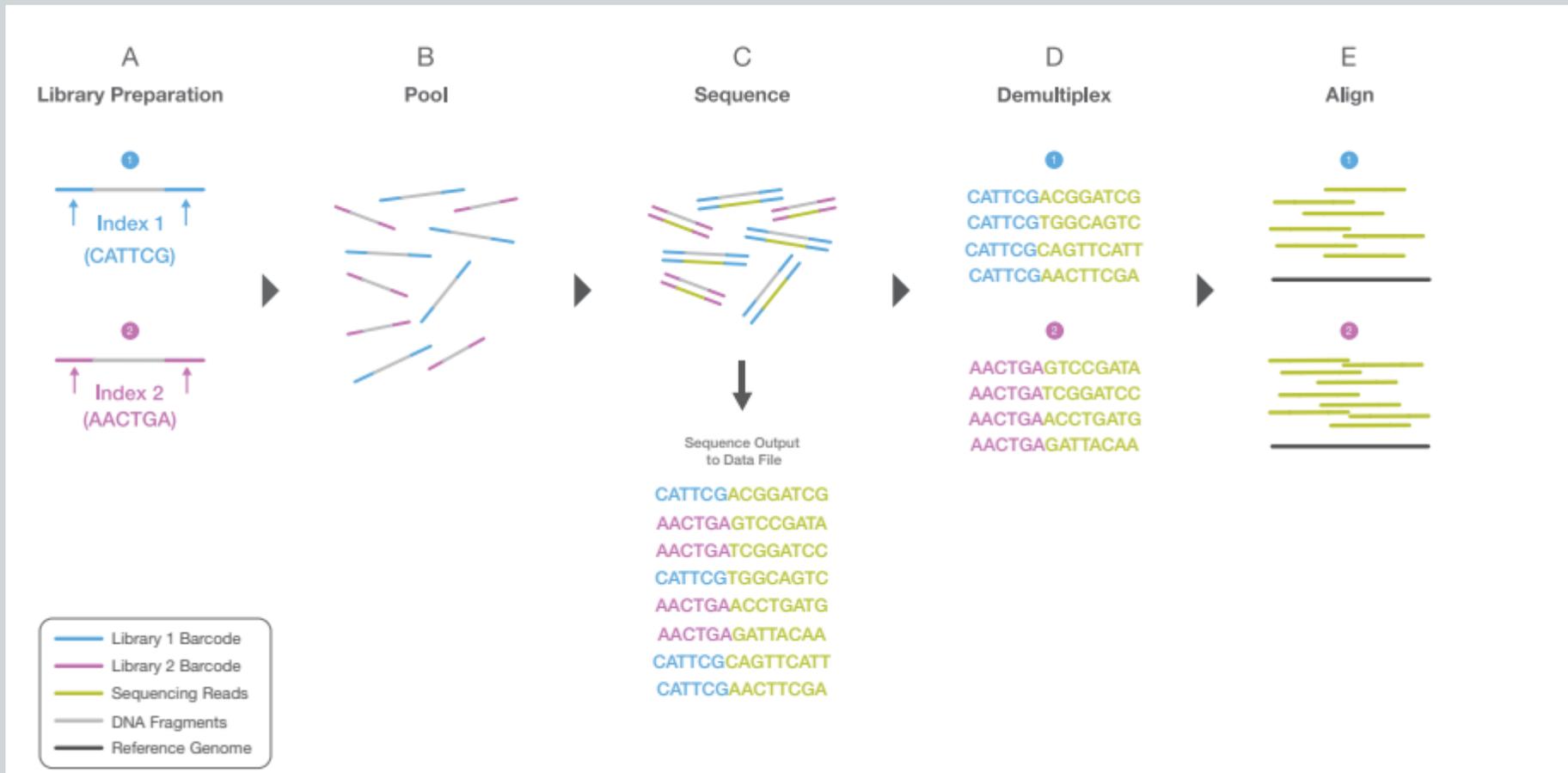
- Alignment of the sequencing reads (also known as ‘[mapping](#)’) to a reference genome;
- Detection of somatic and germline variants (a process known as ‘[variant calling](#)’): single-nucleotide changes, small insertions and deletions, large-scale copy-number variants (CNVs), and structural variants (SVs) such as translocations or inversions;
- Detected variants are evaluated for potential functional and clinical impact in a process known as ‘[variant annotation](#)’ and ‘[variant interpretation](#)’.



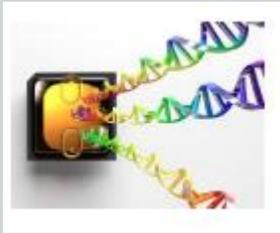
NGS: TARGETED “PANEL” SEQUENCING



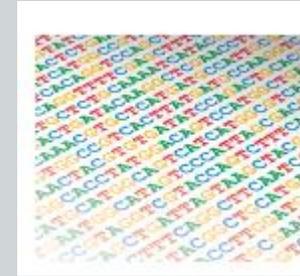
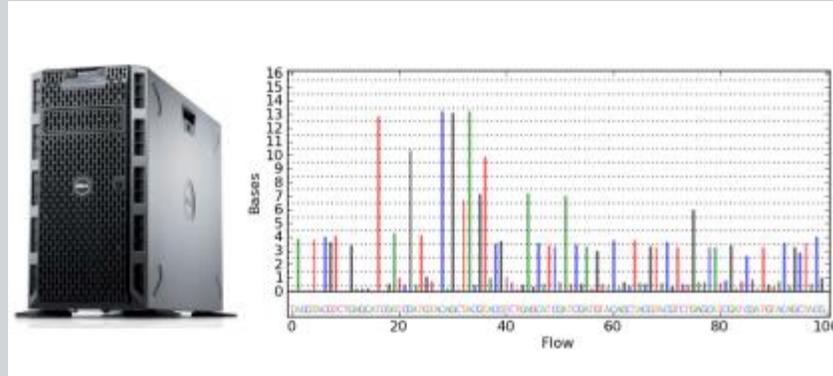
NGS: MULTIPLEXING



ANALISI BIOINFORMATICA



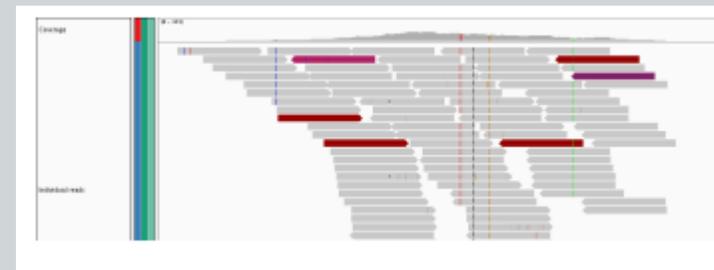
BASECALLING



FAST Q FILE

PRIMARY ANALYSIS

- Alignment to reference genome
- Evaluation of base quality and mapping quality
- Trimming of adapter sequences
- Mark duplicates and bam processing

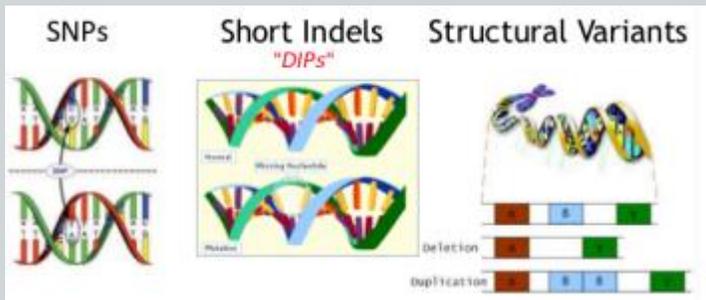


BAM FILE

Es. ANNOVAR (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>)

ANALISI BIOINFORMATICA

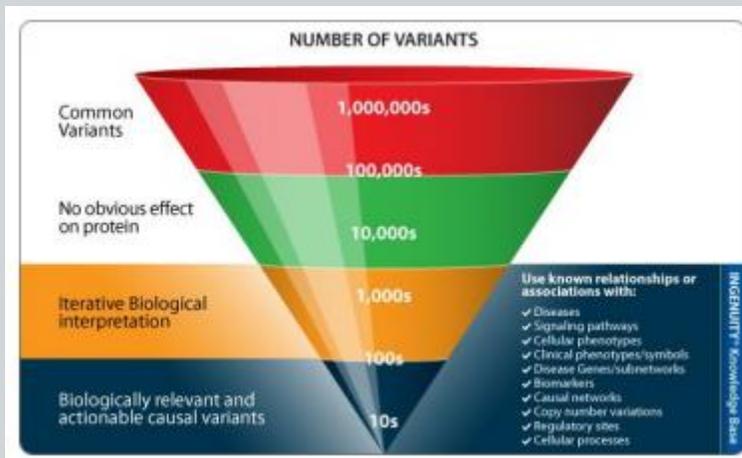
SECONDARY ANALYSIS: identification of DNA variants



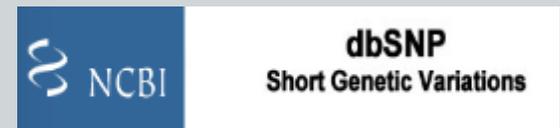
VCF FILE

Evaluation of variants and quality based filtering

TERTIARY ANALYSIS



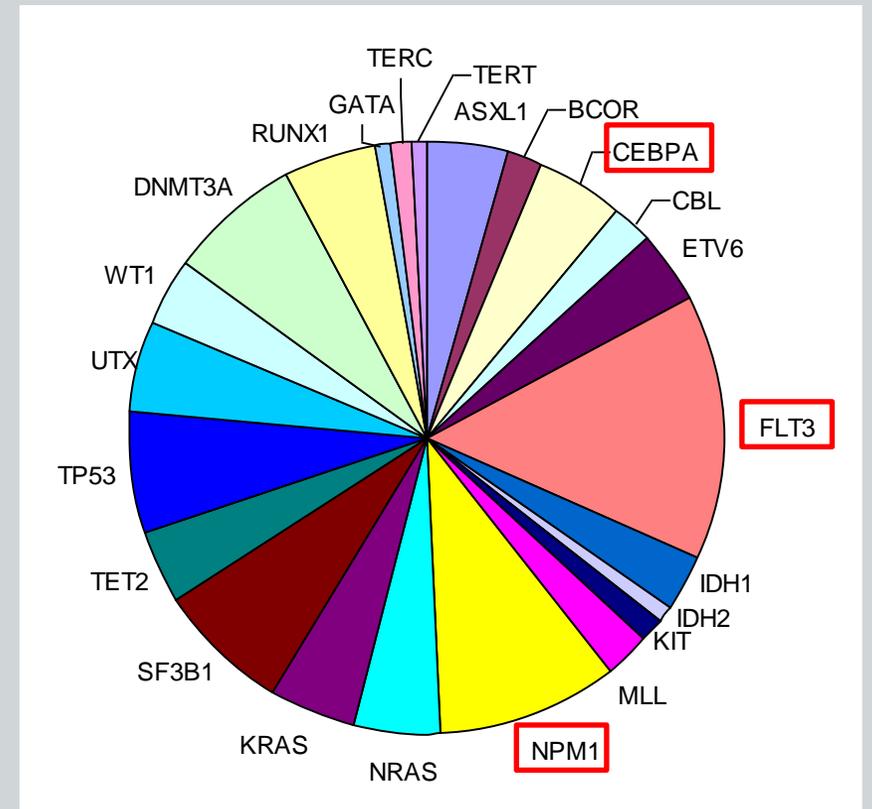
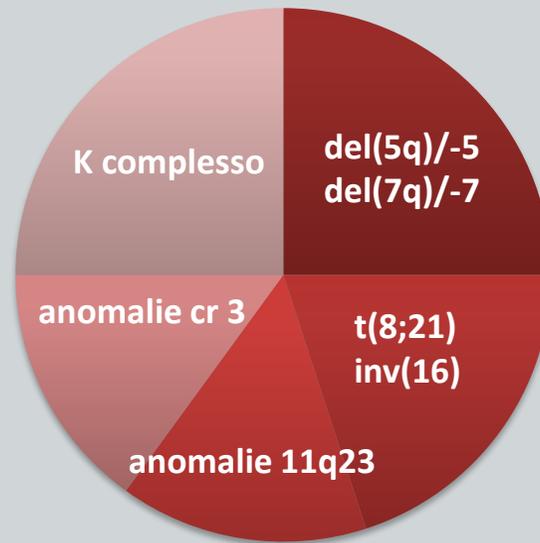
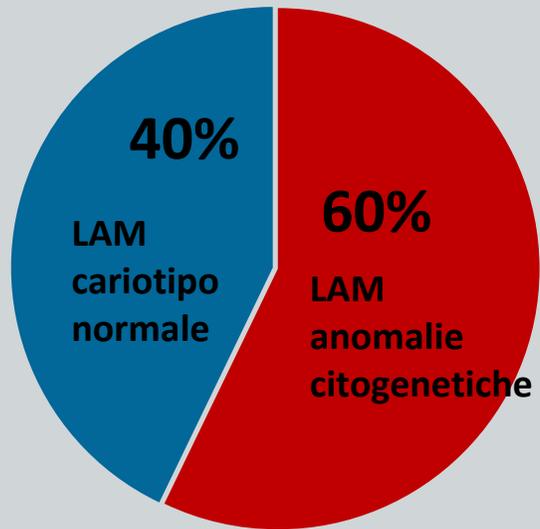
- Annotation and interpretation of variants
- Prioritization of candidates



ESEMPIO DI APPLICAZIONE IN ONCO-EMATOLOGIA

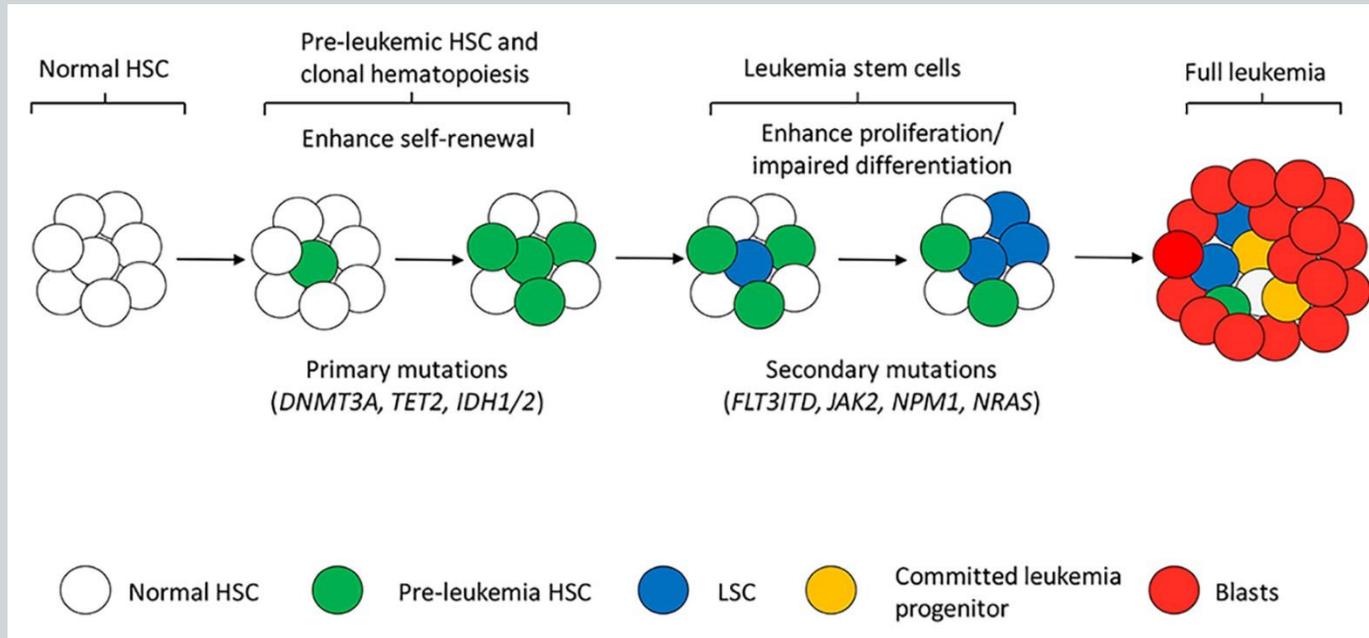
LA CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DELLE LAM

COMPLESSITA' GENOMICA DELLE LAM



Modificato da Dohner et al, Blood 2010

Leucemogenesi



Mutazioni Driver:

portano alla formazione di un clone mutato a cui conferiscono un vantaggio selettivo.

Possono essere:

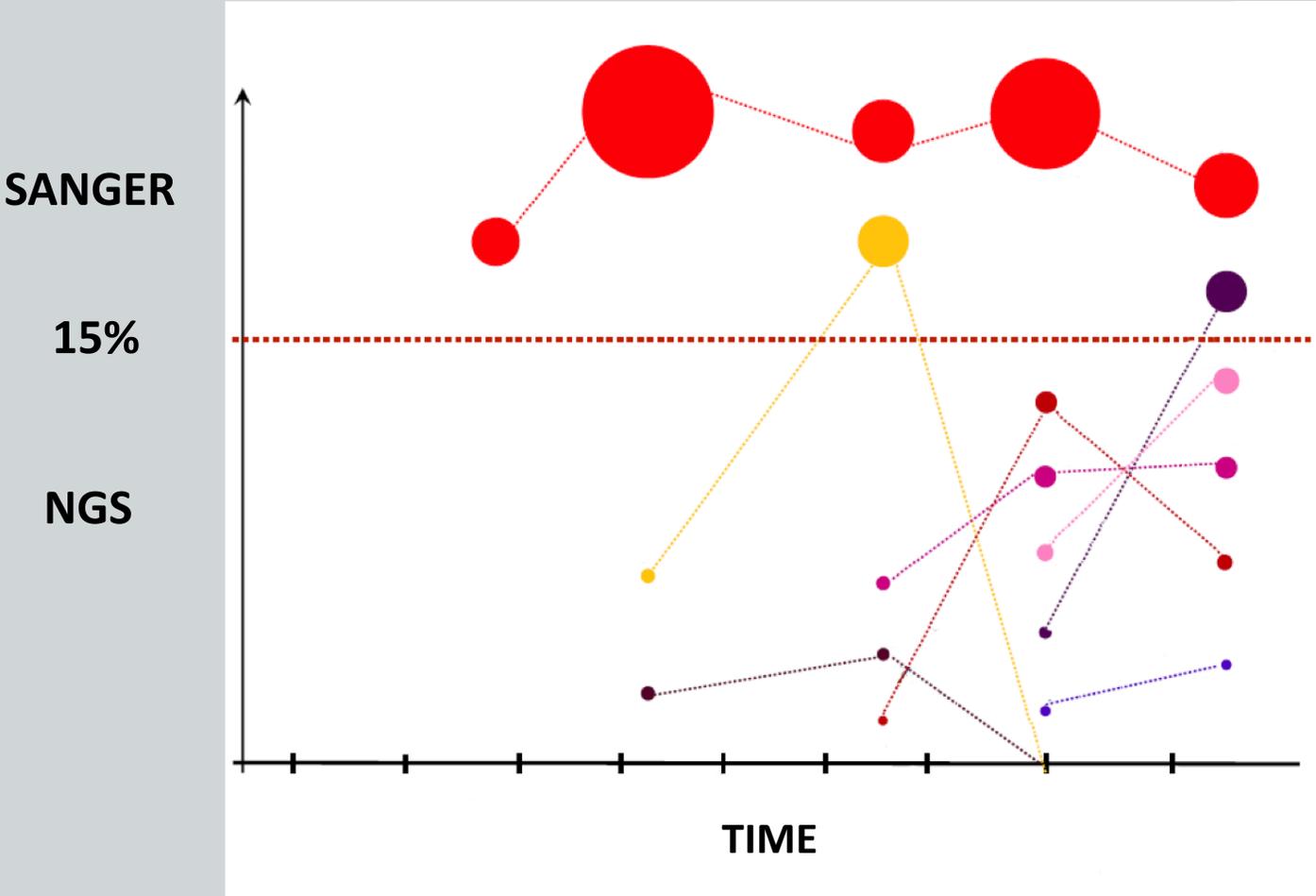
- ❑ Fondanti o inizianti: danno inizio al clone tumorale (mutazioni di NPM1, DNMT3A, IDH1, IDH2, CEBPA, RUNX1, FLT3)
- ❑ Subclonali: mutazioni che avvengono in una cellula già clonale e danno origine a un secondo clone che porta sia la mutazione fondante che quella acquisita (FLT3-drug resistance)



L'insieme delle mutazioni fondanti e subclonali determinano: caratteristiche di presentazione della LAM; aggressività; sensibilità alle terapie

DIAGNOSI CONVENZIONALE DI LAM E NGS

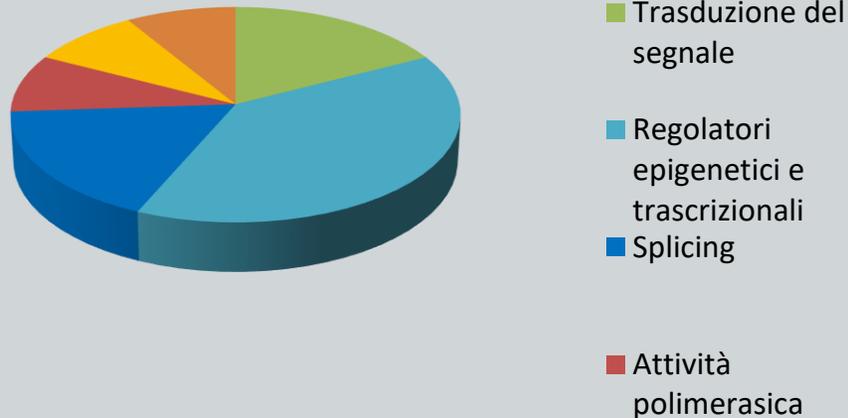
Attualmente le mutazioni geniche sono studiate con metodiche convenzionali: es. Sanger



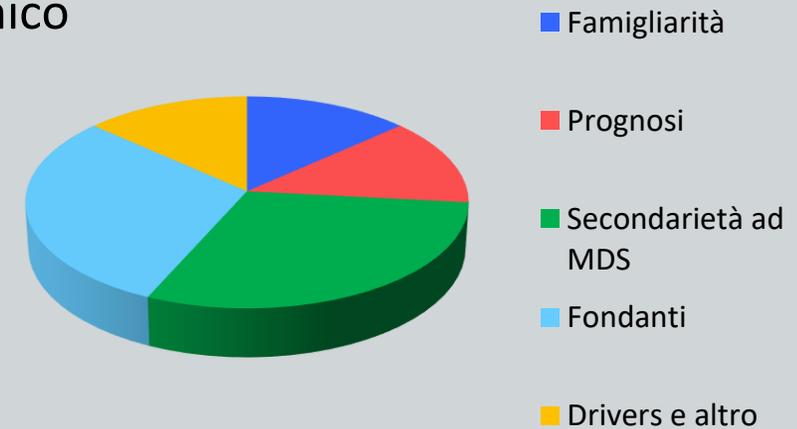
GENE PANEL DEEP SEQUENCING FOR AML

| | | | | | | | | |
|------|------|-------|------|-------|-------|-------|---------|-------|
| FLT3 | TET2 | RUNX1 | TP53 | ASXL1 | BCOR | EZH2 | DNMT3A | SF3B1 |
| KRAS | NRAS | SRSF2 | IDH1 | IDH2 | KMT2A | DDX41 | ZRSR2 | ETV6 |
| CBL | NPM1 | GATA2 | TERT | TERC | CEBPA | U2AF1 | ANKRD26 | SRP72 |

Geni suddivisi in base alla funzione biologica



Geni suddivisi in base all'impatto clinico



Analisi Bioinformatica: ES. SOPHIA GENETICS

1 PANNELLO PER:

- AML
- MDS
- MPN
- CML
- CMML E JMML

Myeloid Solution Panel

| | | | | | |
|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| ABL1 | ASXL1 | BRAF | CALR | CBL | CEBPa |
| CSF3R | DNMT3A | ETV6 | EZH2 | FLT3 | HRAS |
| IDH1 | IDH2 | JAK2 | KIT | KRAS | MPL |
| NPM1 | NRAS | PTPN11 | RUNX1 | SETBP1 | SF3B1 |
| SRSF2 | TET2 | TP53 | U2AF1 | WT1 | ZRSR2 |

30 geni: 10 full,
20 regioni "hotspots"

Coverage minimo 1000X (98%)

ThermoFisher
SCIENTIFIC

illumina[®]

Data
generation
FASTQ

Secondary
Analysis

