www.medicalsystems.it

ISSN 0394 3291

Caleidoscopio
Italiano

Pietro Micheli, Anna Carrabba, Emilio Carrino, Mariacarolina Micheli, Gabriella Piccolo, Giuseppe Salatiello

Aspetti molecolari del carcinoma polmonare

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

237

... il futuro ha il cuore antico

MEDICAL SYSTEMS SpA

Tariffa R.O.C.: "Poste Italiane S.p.a. - Sped. in A.P. - D.L. 353/2003, (conv. in L. 27/02/2004 n. 46) art. 1 comma 1, DCB Genova" - n° 235 Marzo 2016 - Dir. resp.: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Nuova AATA - Genova

Caleidoscopio
Italiano

Pietro Micheli, Anna Carrabba, Emilio Carrino, Mariacarolina Micheli, Gabriella Piccolo, Giuseppe Salatiello

Unità Operativa di Anatomia ed Istologia Patologica e Citologia Diagnostica dell'Azienda Ospedaliera "Dei Colli" Monaldi-Cotugno CTO Napoli

Aspetti molecolari del carcinoma polmonare

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

237

... il futuro ha il cuore antico
MEDICAL SYSTEMS SpA

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. Caleidoscopio pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. I files del testo in formato .doc oppure .rtf, delle fotografie, dei grafici e delle figure in formato .jpeg con una risoluzione di almeno 240 dpi devono essere spediti per posta elettronica al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista Caleidoscopio rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al seguente indirizzo e-mail: rahp80@yahoo.it

Editoriale

La classificazione istologica dei tumori del polmone ha rappresentato e continua a rappresentare il punto di partenza nell'approccio alla diagnosi dei pazienti affetti da questa patologia. È chiaro che gli scenari sono già cambiati, stanno cambiando e continueranno a cambiare in maniera significativa influenzando i protocolli terapeutici che il medico andrà a mettere in atto. Ormai le indagini di biologia molecolare dei tumori fanno parte della diagnostica moderna e con esse è possibile individuare numerose mutazioni che possono permettere di personalizzare le terapie. Risulta quindi evidente da questo, quanto siano importanti due aspetti che questa monografia vuole sottolineare e promuovere: la prima è l'importanza di un approccio diagnostico di precisione (immunoistochimica) da parte del Patologo, unitamente alla multidisciplinarietà che mette in stretta connessione il team che esegue le indagini di biologia molecolare richieste dall'oncologo, per individuare, la strategia terapeutica più corretta. La seconda è la necessità che queste nuove conoscenze di diagnostica molecolare e la sua ricaduta terapeutica abbiano una ampia diffusione in campo medico. Tutte queste moderne conoscenze non possono essere relegate a pochi e ristretti specialisti. L'obiettivo di questa monografia è: cercare di dare la massima diffusione di queste nuove tecnologie ad una platea più ampia possibile.

Il Prof. Pietro Micheli, caposcuola di questo gruppo, dopo aver conseguito il diploma di Laurea in Medicina e Chirurgia ed il Diploma di Specializzazione in Anatomia Patologica (presso Università degli studi di Trieste) ha assunto il ruolo di Assistente Ordinario del Servizio di Anatomia Patologica presso l'Ospedale Ascalesi per poi passare, come Aiuto corresponsabile, al Servizio di Anatomia Patologica dell'Ospedale SS. Annunziata di Napoli e quindi, sempre con lo stesso incarico, al Servizio di Anatomia Patologica "D. Cotugno" sino al momento in cui, vincitore di concorso, è stato chiamato al ruolo di Direttore dell'Unità Operativa di Anatomia ed Istologia Patologica e Citologia Diagnostica dell'Azienda Ospedaliera "Dei Colli" Monaldi-Cotugno CTO Napoli. La stretta collaborazione scientifica con il Prof. Antonio Giordano della Jefferson Medical College Sbarro Institute

Cancer Research Molecular Medicine di Caleidoscopio Italiano Editoriale Philadelphia, P.A., U.S.A. in particolare sulle oncoproteine si è concretizzata in numerose pubblicazioni sulle migliori riviste internazionali di anatomia patologica animato sempre dall'interesse per le tecniche innovative nel campo dell'Anatomia Patologica.

La dott.ssa Anna Carrabba, già biologa, dopo aver conseguito anche la Laurea in Tecniche di Laboratorio biomedico presso l'Università degli Studi di Napoli Federico II, svolge il ruolo di Tecnico di laboratorio volontario presso l'U.O.C. di Anatomia ed Istologia Patologica dell'Azienda Ospedaliera "Dei Colli" Monaldi.

Il dottor Emilio Carrino dopo aver conseguito la Laurea in Biotecnologie per la Salute presso l'Università degli studi di Napoli Federico II collabora presso l'U.O.C. di Anatomia ed Istologia Patologica e Citologia Diagnostica dell'Azienda Ospedaliera "Dei Colli" Monaldi dove attualmente si occupa di biologia molecolare.

La dott.ssa Mariacarolina Micheli ha conseguito la Laurea Magistrale in Scienze Biologiche, Biodiversità, Conservazione e Qualità Ambientale alla Federico II di Napoli, ha operato come Tirocinante e Stagista di ricerca in laboratorio ed attualmente è Biologa volontaria presso il laboratorio di Patologia Molecolare dell'U.O.C. di Anatomia ed Istologia Patologica dell'Azienda Ospedaliera "Dei Colli" Monaldi.

La dott.ssa Gabriella Piccolo ha svolto il Tirocinio Universitario e la preparazione della tesi presso l'U.O.C. di Anatomia ed Istologia Patologica, laboratorio di Patologia Molecolare. Dopo aver conseguito la Laurea Magistrale in Biologia presso la Seconda Università degli Studi di Napoli, continua a prestare la Sua opera presso la stessa struttura dove ha svolto la preparazione della Tesi di Laurea, in qualità di volontaria dedicandosi alle tecniche di biologia molecolare, immunoistochimica e FISH.

Il dottor Giuseppe Salatiello dopo aver conseguito la Laurea triennale in Tecnico di Laboratorio Biomedico ha lavorato, come Tecnico di Laboratorio, in diverse strutture sanitarie. Attualmente svolge il proprio ruolo, occupandosi di Istopatologia e Diagnostica Molecolare, presso l'A.O.R.N. "Azienda Ospedaliera dei Colli" Monaldi-Cotugno-CTO.

Sergio Rassu

Dedica

A tutti coloro che amano la vita ed ai giovani

Premessa

Il laboratorio di Anatomia Patologica negli ultimi anni sta vivendo un periodo di profondo cambiamento. L'avvento della target therapy e la possibilità di diagnosi sempre più accurate hanno determinato la necessità di integrare la tradizionale diagnosi morfologica con indagini immunoistochimiche e molecolari sempre più specifiche. L'inserimento continuo di nuovi marcatori e la necessità di effettuare indagini molecolari richiede al laboratorio di patologia molecolare sempre maggiore flessibilità. L'Anatomia Patologica assume sempre più un carattere di multidisciplinarietà e ne restituisce una posizione sempre più centrale in tutto l'iter diagnostico e prognostico del paziente.

Essendo l'80% dei pazienti affetti da carcinoma polmonare in uno stadio avanzato, non può usufruire di una terapia chirurgica. Ne scaturisce l'esigenza di avere a disposizione piccole biopsie o campioni citologici che devono essere utili non solo al patologo per formulare una diagnosi di precisione ma anche all'oncologo per avere la possibilità di richiedere al Laboratorio di Patologia Molecolare dell'UOC di Anatomia Patologica la ricerca dei geni e delle loro mutazioni che permetteranno, così, di effettuare un profilo genico delle neoplasie in studio.

Introduzione

Il carcinoma del polmone è la causa di morte più frequente per cancro nel mondo, rappresentando circa l'11% di tutte le nuove diagnosi di tumore nella popolazione generale e, più in particolare, il 15% nei maschi ed il 6% nelle femmine. Ad oggi si stima che 1 uomo su 9 ed una donna su 37 sviluppi un tumore del polmone nel corso della vita.

Il tumore del polmone permane, ancora oggi, una neoplasia a prognosi particolarmente sfavorevole.

Le neoplasie del polmone si verificano non solo per fattori genetici (si parla in tal senso di ruolo della predisposizione genetica ed in particolare dei polimorfismi genici) ma anche ambientali.

Di fatto conoscere i rischi e fare dove possibile prevenzione, sono sicuramente elementi importantissimi per abbassare l'incidenza della patologia.

Il fumo di tabacco costituisce il più importante fattore di rischio per l'insorgenza del tumore del polmone, e si ritiene sia responsabile dell'85% dei casi osservati.

Gli ultimi studi collaborativi europei e le metanalisi dei dati disponibili evidenziano inoltre, per i fumatori passivi, un aumento del rischio tra il 20% ed il 50% rispetto ai non fumatori.

I tumori possono essere suddivisi in:

- benigni
- maligni

I tumori benigni possono essere suddivisi in:

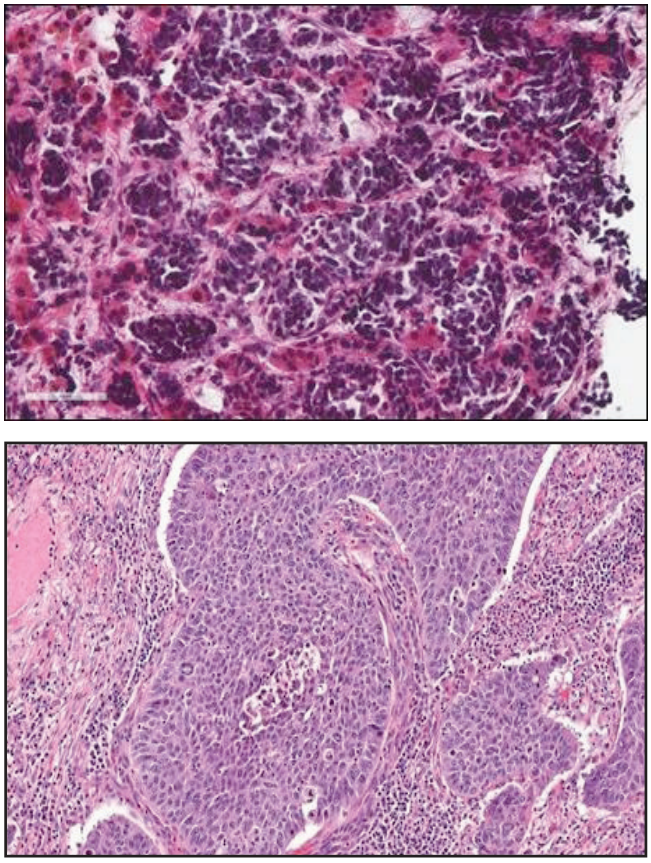
- papillomi
- adenomi

I tumori maligni invece sono a loro volta suddivisi, secondo l'ultima classificazione mondiale WHO 2015:

- tumori epiteliali
- tumori mesenchimali

- lesioni linfoproliferative
- tumori di origine ectopica
- tumori metastatici

I più frequenti sono i tumori epiteliali, ed in particolare due istotipi (Fig. 1):
- adenocarcinomi (ADC)
- squamosi (SQC)



1

2

Figura 1. Istotipi tumorali
1: adenocarcinoma.
2: squamoso.

La classificazione di un tumore prevede anche la sua stadiazione pTNM in base a cui distinguiamo,

T: dimensione del tumore
N: numero di linfonodi metastatici
M: metastasi

per il parametro T quanto segue:

- pT1: in cui il tumore è inferiore di 3 cm (distinto a sua volta in a e b);
- pT2: in cui il tumore è maggiore di 3 cm ma non superiore a 7 cm (distinto a sua volta in a e b);
- pT3: tumore maggiore di 7cm;
- pT4: tumore di qualsiasi dimensione;

per il parametro N:

- N1: peribronchiali omolaterali e ilari omolaterali;
- N2: mediastinici omolaterali e sottocarenali omolaterali;
- N3: mediastinici ilari contro laterali e scalenici o sovraclaveari;

per il parametro M:

- M0: in cui si ha assenza di metastasi;
- M1: in cui si ha metastasi a distanza (distinto a sua volta in a e b).

Pre-analitica e tracciabilità

Il campione anatomico va trattato con attenzione in tutte le diverse fasi del percorso, suddivisibili come segue:

1. Fase pre-analitica
2. Fase analitica
3. Fase post-analitica

Per garantire una maggiore correttezza della fase pre-analitica bisogna avvalersi di opportuni strumenti. Di fatto nelle strutture ospedaliere sono stati introdotti strumenti per il sottovuoto del campione biologico (importante per la preservazione antigenica e la preservazione di RNA e DNA), carrelli con frigo a temperatura costante +4 °C per il trasporto del materiale dalla sala operatoria al laboratorio di Anatomia Patologica. I benefici dell'utilizzo del sottovuoto sono: assenza di aria che rallenta i processi autolitici e velocizza il raffreddamento del tessuto. In questo caso i campioni pervengono in condizioni "as fresh" mantenendo colori e consistenza reali. Con il sottovuoto si utilizza, così, sempre la giusta quantità di formalina in base alle dimensioni del campione ottenendo fissazione e risultati istologici ottimali. Tutto ciò ha portato a benefici sia nelle fasi analitiche che post-analitiche, ma soprattutto nei risultati dei test molecolari.

Il tutto sempre conforme alle linee guida Europee, SIAPEC-IAP e Regionali.

I sistemi di tracciabilità sono, per definizione e funzionalità, i migliori strumenti per il monitoraggio della qualità, dell'efficienza e dei costi di un laboratorio di Anatomia Patologica. Un buon sistema di tracciabilità, se interfacciato alle strumentazione ed al sistema gestionale di laboratorio, restituisce tutte le statistiche necessarie per una corretta gestione dei costi. Il controllo di qualità è indispensabile e complementare all'analisi del costo standard.

Casistica ospedale Monaldi

Volendo osservare i casi di tumore al polmone (Fig. 2) registrati presso U.O.C di Anatomia Patologica dell'A.O.R.N. dei Colli (ospedale Monaldi) nell'anno 2015, è possibile notare quanto segue:

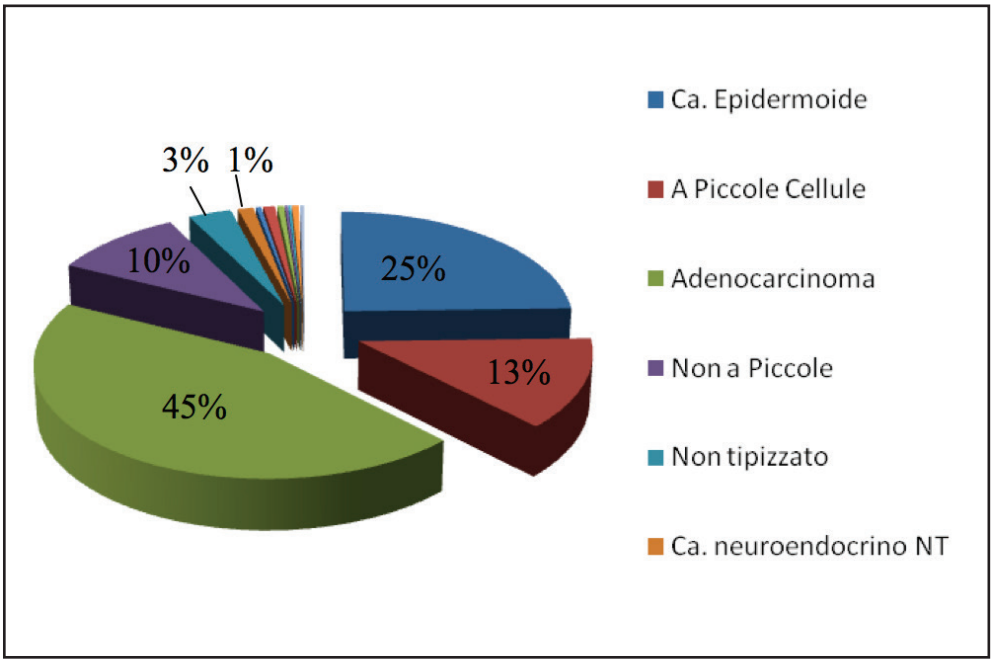


Figura 2. Distribuzione percentuale dei casi di tumore del polmone registrati presso l'ospedale Monaldi nell'anno 2015.

Su 997 casi diagnosticati di tumore polmonare, l'istotipo più frequente è l'adenocarcinoma con il 45% di casi riscontrati. Seguono poi con il 25% il carcinoma squamoso (epidermoide) , con il 13% il carcinoma a piccole cellule e con il 10% di casi il carcinoma non a piccole cellule. Con percentuale inferiore abbiamo i tumori neuroendocrini (NET).

Casi e tecniche

I campioni che pervengono nella U.O.C. di Anatomia Patologica possono essere istologici e citologici. I primi sono suddivisibili tra biopsie e campioni operatori; mentre i citologici sono suddivisi in base all'allestimento, che può essere o su strato sottile o con citoincluso (Fig.3-4-5). Fondamentale risulta esser la citoassistenza, ottenuta grazie alla collaborazione tra Anatomopatologo e Radiologo, in modo da ottenere campioni idonei e giusta quantità di materiale.

Figura 3. Allestimento campioni citologici su strato sottile.

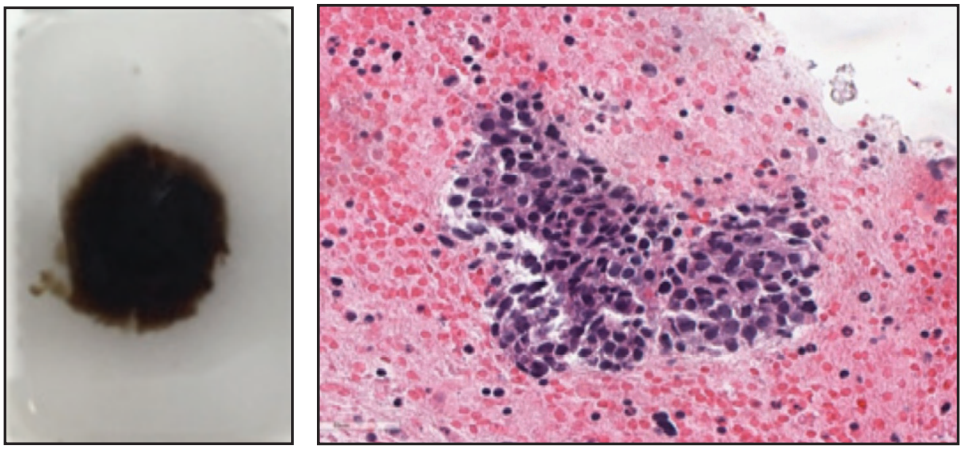


Figura 4. Allestimento citoincluso con E/E.

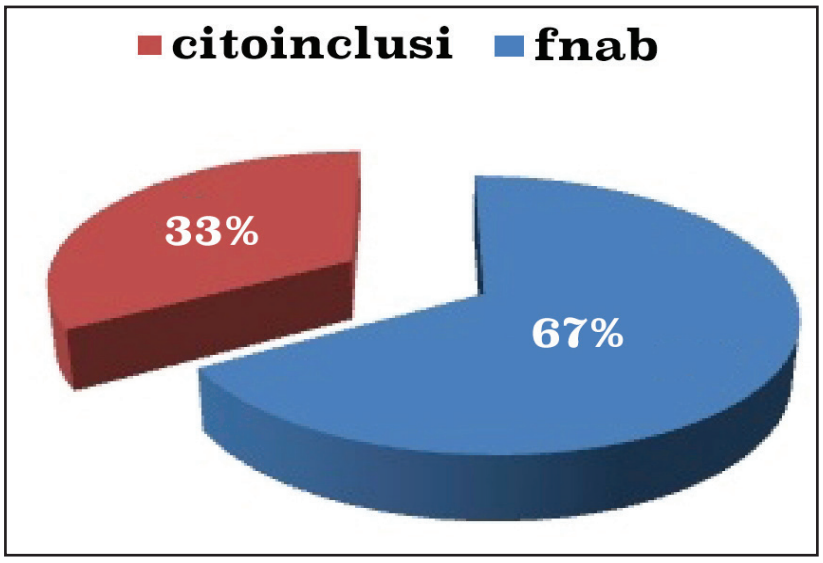


Figura 5. Percentuale di Fnab e citoinclusi pervenuti nell'anno 2015 presso l'U.O.C. di Anatomia Patologica.

Gli adenocarcinomi (ADC) sono i tumori più frequenti, seguiti da quelli squamosi (SQC).

La diagnosi di adenocarcinoma (ADC) del polmone può essere eseguita sull'attenta valutazione dei criteri morfologici convenzionali su ematossilina-eosina. Per i casi poco differenziati risultano fondamentali le indagini immunoistochimiche.

L'istotipo ADC è solitamente positivo per TTF-1 (ThyroidTranscription Factor-1), citocheratina 7 e napsina A ; lo squamoso (SQC) esprime p40, p63, citocheratine ad alto peso molecolare (es. CK5/6) e desmocollina-3 (cromogranina, sinaptofisina, CD56 sono i migliori marcatori invece per le neoplasie neuroendocrine) (Fig.6-7-8-9). Tuttavia è da ricordare che anche la metodica IIC non è sempre risolutiva ed, in alcuni casi, possono osservarsi immunofenotipi anomali.

POSITIVITA' PER:

- TTF-1
- CK 7
- NAPSINA A
- PROTEINA SURFACTANT

Figura 6. Adenocarcinoma.

POSITIVITA' PER:

- P 40
- CK 5/6
- CK 34 β E 12 (alto peso)
- DESMOCOLLINA 3
- P 63

Figura 7. Squamoso.

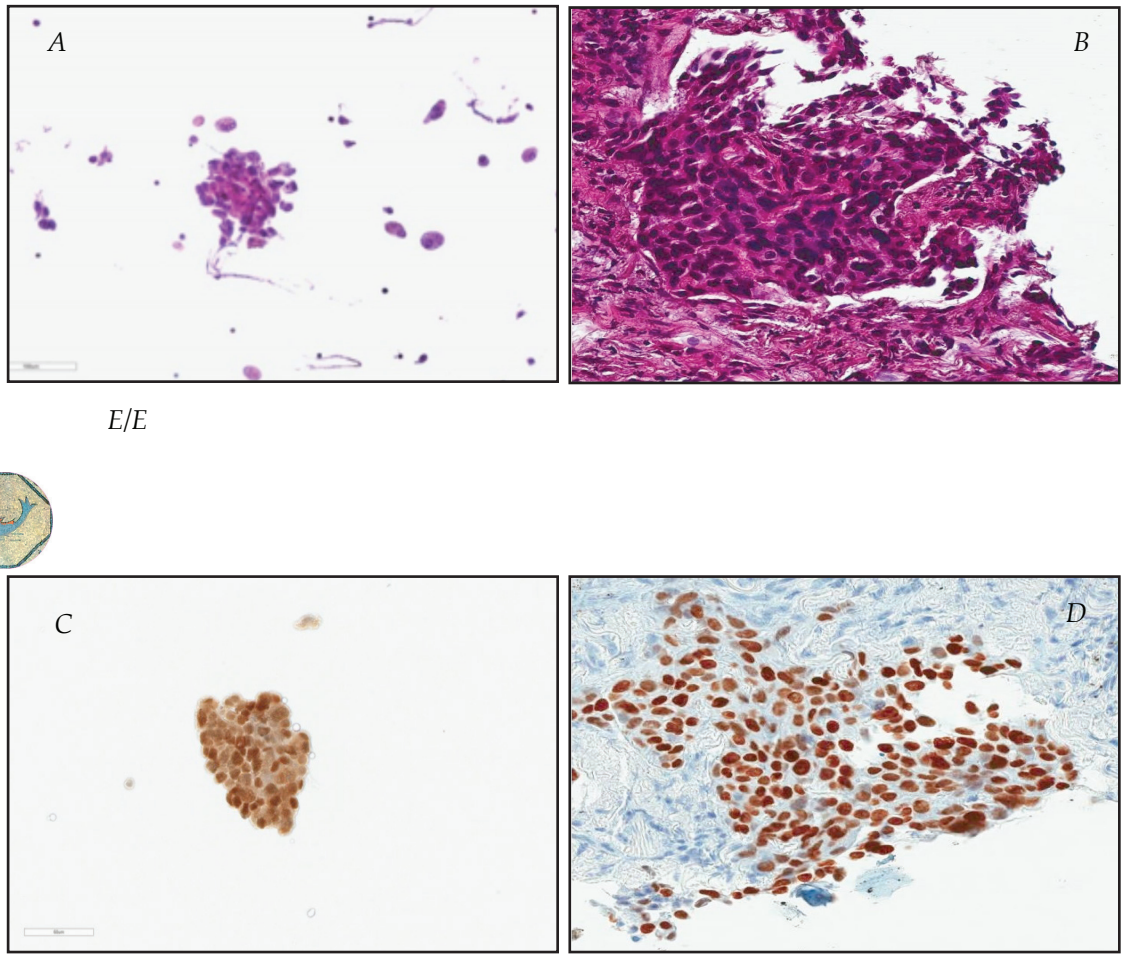


Figura 8. Immagini di adenocarcinoma:

A= E/E citologia su strato sottile
B= E/E pezzo operatorio
C= TTF1 citologia su strato sottile
D= TTF1 pezzo operatorio

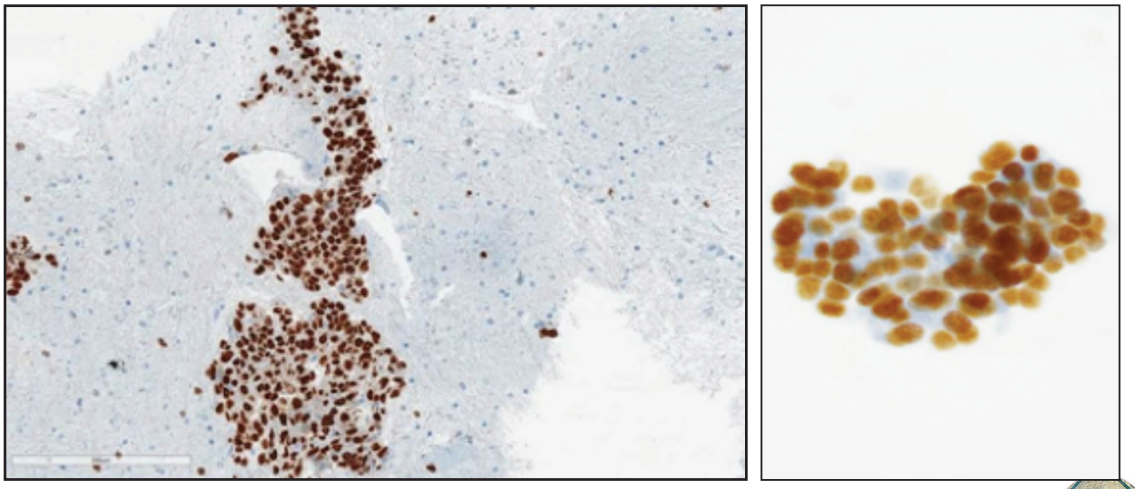


Figura 9. Immagini di squamoso positivi per p40.

Dopo che il patologo ha effettuato la diagnosi le divisioni di oncologia pneumologica e oncologia generale chiedono quelle che sono le indagini di biologia molecolare, eseguibili attraverso diverse piattaforme.

Questo perché negli ultimi anni lo studio delle caratteristiche molecolari dei tumori del polmone ha messo in evidenza un ruolo specifico di alcuni geni che rappresentano importanti bersagli terapeutici, la cui presenza rappresenta il più importante fattore predittivo per adottare terapie a bersaglio molecolare con specifici inibitori.

Le piattaforme utilizzate per le analisi di biologia molecolare, nello specifico sono real time e/o microarray per l'analisi di EGFR, BRAF e RAS, la metodica FISH per l'analisi del gene ALK e ROS 1. L'elevata sensibilità e specificità dei metodi, permette di individuare mutazioni anche in campioni biologici esigui, consentendo ai pazienti di poter usufruire di mirate terapie biologiche.

Estrazione del DNA

E' indispensabile per un'estrazione ottimale selezionare l'area tumorale sia da materiale istologico che citologico, precedentemente allestito su vetrino, che deve essere ben rappresentativa (almeno il 30% delle cellule neoplastiche).

Prelevate le cellule dal vetrino, vengono riposte in una eppendorf, lisate con un apposito tampone e successivamente trattate con la proteinasi K alla temperatura di 90 °C, temperatura che permette di liberare il DNA. Il DNA così ottenuto viene purificato attraverso dei filtri attivi e delle soluzioni tampone.

La quantità di DNA necessaria per eseguire i vari test varia a seconda dell'analisi e del metodo da utilizzare e può essere misurata attraverso spettrofotometria.

Protocollo operativo

1) Porre in un eppendorf da 2ml tre sezione tagliate a 10 μm del campione da analizzare (preferibilmente solo l'area di interesse);
2) segue la fase di digestione enzimatica, aggiungendo nell'eppendorf 160 μl di soluzione deparaffinante, si vortexa 10 secondi e dopo una veloce centrifugata si incubano i campioni in un bagnetto a 56°C per 3 minuti. Dopo di ciò, si attende qualche minuto affinché le eppendorf con i campioni ritornino a temperatura ambiente, si aggiungono 180 μl di Buffer di Lisi del tessuto e dopo aver vortexato e centrifugato a 11000 giri per 1 minuto, si aggiungono 20 μl di proteinasi K sul fondo dell'eppendorf (dove si è formato uno strato chiaro e dove vi è dunque il nostro campione) e si incuba in bagnetto termostato a 56°C over night.

Il passaggio successivo per inattivare l'enzima e denaturare il DNA prevede una temperatura di 90 gradi per un'ora, che viene eseguito al mattino seguente;

3) step successivo è l'estrazione;

Una volta estratto, il DNA ottenuto va stimato con uno spettrofotometro (che prima di essere usato deve essere tarato con il bianco rappresentato dall'Elution Buffer che è il mezzo in cui è sospeso il DNA da stimare) utilizzando una goccia di eluato (2μl).

Questa operazione può anche essere eseguita utilizzando lo stesso termociclatore, effettuando quella che viene definita corsa di quantizzazione.

PCR Real-Time

La Real-Time PCR è una tecnica molecolare che consente il rilevamento quantitativo "in tempo reale" delle principali mutazioni del DNA genomico isolato da tessuto tumorale.

Si basa sulla quantità di amplificato, correlata direttamente all' emissione di fluorescenza. I campioni aggiunti ad una mix di reazione vengono "caricati" su di un apposito termocycler, costituito da una piastra, che permette la regolazione della temperatura che varia ciclicamente durante la reazione. Ad esso è accoppiato un opportuno dispositivo fluorimetrico capace di misurare l'intensità del segnale fluorescente emesso dalle sonde marcate con fluorocromi ibridate sul DNA.

Il principio a cui si ispira la PCR è la replicazione del DNA. Si parte da un DNA stampo che contenga la regione da amplificare a cui si aggiunge la Master Mix in cui c è uno specifico DNA a singola elica (primer o innesco), 2 oligonucleotidi sintetici complementari a 2 regioni che si trovano su filamenti opposti del DNA stampo forward (senso) e reverse (anti-senso), 4 desossinucleotiditrifosfati (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), tamponi e ioni bivalente Mg^{+2}.

Per permettere l' amplificazione si aggiunge alla master mix ed al campione una polimerasi termostabile (Taqpol). Il processo di PCR prevede un certo numero di cicli a varie T° ed ognuno consta di 3 passaggi:

- Denaturazione (92-95 °C)
- Annealing (50-65 °C, in base all'ibridazione dei primers)
- Allungamento (68-72 °C)

Ad ogni ciclo la quantità di DNA target aumenta in modo esponenziale.

La corsa permette il contemporaneo rilevamento del target, mediante una sonda marcata con FAM e di un gene di controllo endogeno, mediante una sonda marcata con HEX.

L'amplificazione del gene di controllo interno permette di verificare la corretta esecuzione della procedura di amplificazione e l'eventuale presenza di inibitori che possono dare risultati falsamente negativi.

Protocollo operativo

Quantizzazione

1) Si scongelano unitamente ai campioni da analizzare, un controllo positivo, un controllo negativo, la master mix di controllo e la taq polimerasi;
2) si aggiungono ai controlli e campioni da analizzare (5 μl

rispettivamente) la quantità richiesta dal kit utilizzato di master mix e Taq polimerasi;

3) si inseriscono le "provettine" nel termociclatore e si avvia il programma;

4) al termine della seduta di lavoro il software consente l'analisi dei dati sia nel canale del giallo che del verde (previo inserimento del threenshold e di eventuali take off adj o altro richiesto dal kit commerciale utilizzato).

Si avranno valori di ct che dovranno essere inferiori, maggiori o compresi in range specifici propri dei protocolli del kit utilizzato e diversi ovviamente anche a secondo del gene che si sta studiando (valori corrispondenti indicheranno l'idoneità del DNA, diversamente saranno indice di campione troppo concentrato, ed in tal caso sarà possibile effettuare delle diluizioni, o già troppo diluito, caso in cui bisognerà ripetere l'estrazione).

Protocollo operativo
Amplificazione

1) Si scongelano unitamente ai campioni da analizzare, un controllo positivo, un controllo negativo, la master mix di controllo, le master mix delle mutazioni da ricercare e la Taq polimerasi;

2) si aggiungono ai controlli ed ai campioni da analizzare (5 μl rispettivamente) la quantità richiesta dal kit utilizzato di master mix e Taq polimerasi (operazione da eseguire per tutte le singole mutazioni ricercabili) ;

3) si inseriscono le "provettine" nel termociclatore e si avvia il programma;

4) al termine della seduta di lavoro il software consente l'analisi dei dati sia nel canale del giallo che del verde (previo inserimento del threenshold e di eventuali take off adj o altro richiesto dal kit commerciale utilizzato).

Per poter validare la seduta analitica bisogna (in primis) verificare che i controlli rientrino nei range indicati dalla ditta produttrice del kit in uso, successivamente si dovrà controllare che i ct delle singole mutazioni rientrino in range specifici, poi per effettuare l'analisi bisognerà vedere il Δct ottenuto facendo la differenza tra il ct della mutazione e quello del ct di controllo rientri nei valori delle tabelle propri del kit in uso.

Analisi con microarray

La parte di analisi su microarray si avvale dell'utilizzo di uno strumento automatizzato nel quale aggiungendo i campioni già amplificati, che fungeranno da stampo per l'estensione dei primers di rilevazione, si andrà a denotare l'ibridazione con dei chip in cui sono immobilizzati i singoli filamenti di DNA mutato. Pertanto qualora ci sarà ibridazione significherà che il gene oggetto d'interesse è mutato.

La metodica prevede l'amplificazione del DNA tramite tecnica multiplex PCR (la cui master mix è costituita da Amp mix e TitaniumTaq DNA polimerasi) con successiva purificazione dell'amplicone (passaggio cruciale per garantire che i substrati rimanenti non interferiscano con l'amplificazione del segnale) che viene effettuata usando un'apposita miscela costituita da SAP (fosfatasi alcalina), esonucleasi e TitaniumTaq.

I campioni vengono caricati su dei microchip in maniera automatica dove avviene l'ibridazione che sarà rilevata grazie all'incorporazione di nucleotidi marcati (dCTP marcati con Cy5), tramite cui la fluorescenza sarà letta solo negli spots in cui si vanno a legare i primers estesi (Fig.10).

Protocollo operativo

Dopo aver effettuato l'estrazione (come precedentemente detto) si procede come segue:

1) amplificazione del DNA tramite tecnica multiplex PCR (la cui master mix avrà un volume di 18.0 μl ottenuti sommando 17.8 μl di PCR Amp mix e 0.2 μl di TitaniumTaq DNA polimerasi);

2) purificazione dell'amplicone (passaggio cruciale per garantire che i substrati rimanenti non interferiscano con l'amplificazione del segnale) che viene effettuata usando un'apposita miscela costituita per ogni campione da 1.500 μl di SAP (fosfatasi alcalina), 0.375 μl di esonucleasi I ed 0.125 μl di TitaniumTaq;

3) inserimento dei campioni su apposito apparecchio per esser analizzati su microarray;

4) rilevazione del segnale ed analisi mediante apposito software dell'analizzatore.

Tal tecnica ha un'alta specificità ed anche un'alta sensibilità, ottenuta nella stessa amplificazione e nell'uso dello stesso enzima utilizzato tanto per la PCR, quanto per la DPE.

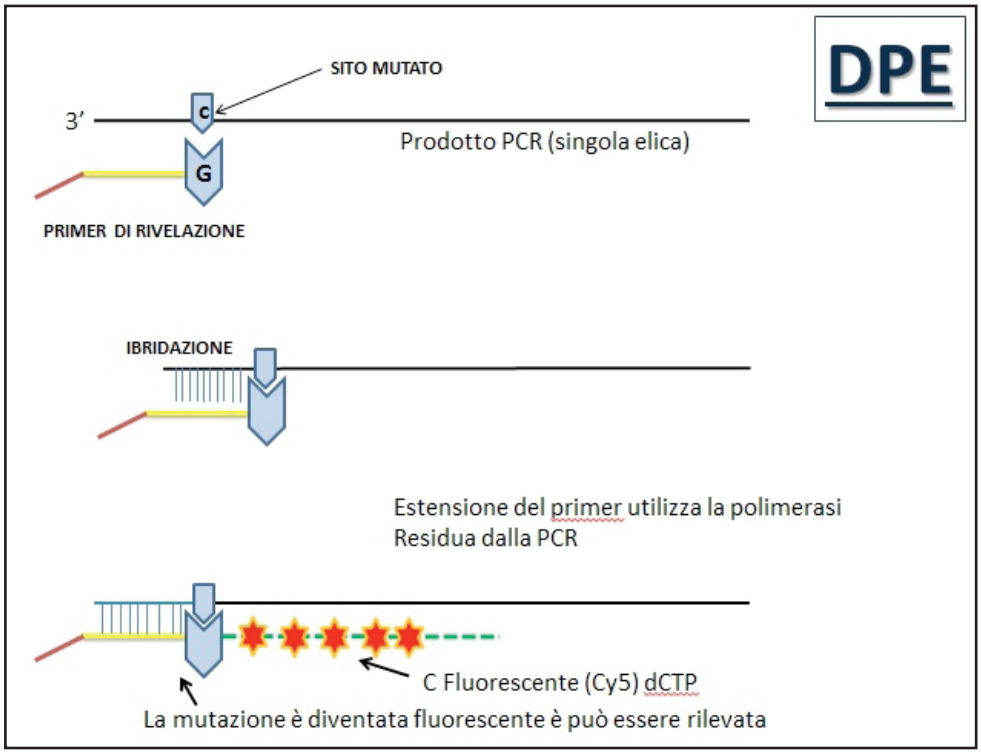


Figura 10. Estensione dei primers.

Metodica FISH

L'analisi FISH, è un'ibridazione in situ fluorescente, ovvero un processo in cui l'ibridazione tra l'eventuale gene mutato presente nel nostro campione e la sonda specifica verrà evidenziata grazie all'utilizzo di una particolare molecola fluorescente. La lettura del vetrino sarà effettuata tramite microscopio a fluorescenza.

Il vantaggio, rispetto alla marcatura con isotopi radioattivi, è rappresentato dall'eliminazione del radioattivo, dall'ottenimento di un "segnale" più nitido e dalla possibilità di usare fluorocromi a diversa emissione cromatica, consentendo l'utilizzo e la visualizzazione contemporaneamente di più sonde.

Ad oggi rappresenta il gold standard per la ricerca di riarrangiamenti di alcuni geni importanti per la diagnosi di NSCLC (ALK e ROS-1). La tecnologia, riguardante le analisi da effettuare in Anatomia Patologica, è disponibile in Kit commerciali sviluppati per uso diagnostico, e validati su campioni istologici fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE).

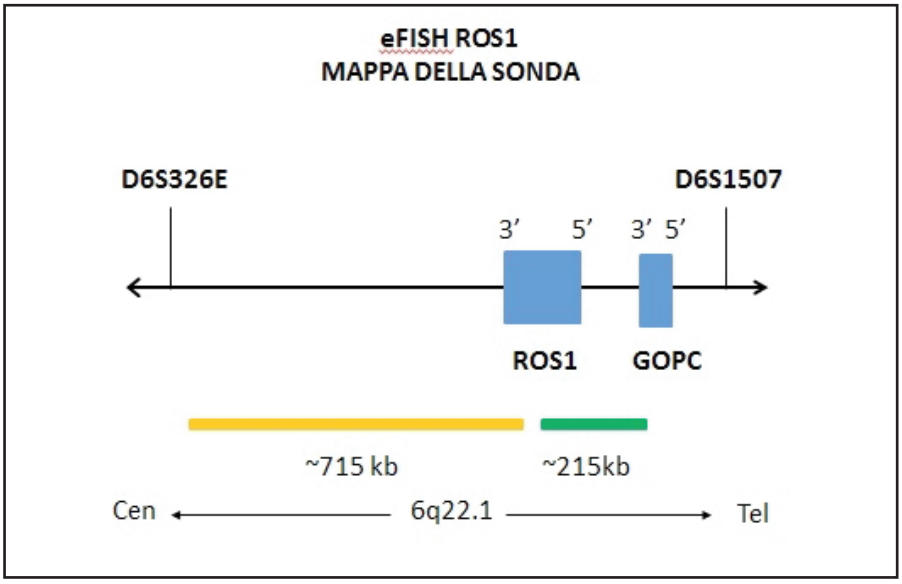
La sonda ALK Dual Color Break Apart, con filtri appropriati, produce segnale arancio e verde nelle zone di ibridazione della regione cromosomica 2p23. Le cellule interfase normali o le cellule senza traslocazione 2p23 producono due segnali di fusione arancio/verde non separati che, indicano la fusione per nucleo. Nelle regioni in cui c è la traslocazione 2p23, si osservano un segnale verde ed un segnale arancione, separati uno dall' altro.

L'identica situazione si verifica nel caso dell'utilizzo della sonda ROS1 Dual Color Break Apart (Fig.11-12) ma visualizzando la traslocazione 6q22.

Le sezioni di 3,5 μm sparaffinate e idratate sono pretrattate con opportuno buffer e con la proteasi per eliminare i legami della formalina, per lisare il tessuto e permettere di liberare i nuclei.

Il DNA libero viene denaturato alla temperatura di circa 77 °C e si aggiunge la sonda specifica. Infine si aggiunge la DAPI (colorante fluorescente che si intercala tra le basi del DNA e permette la rivelazione del nucleo).

I vetrini vanno conservati al buio a -20 °C.



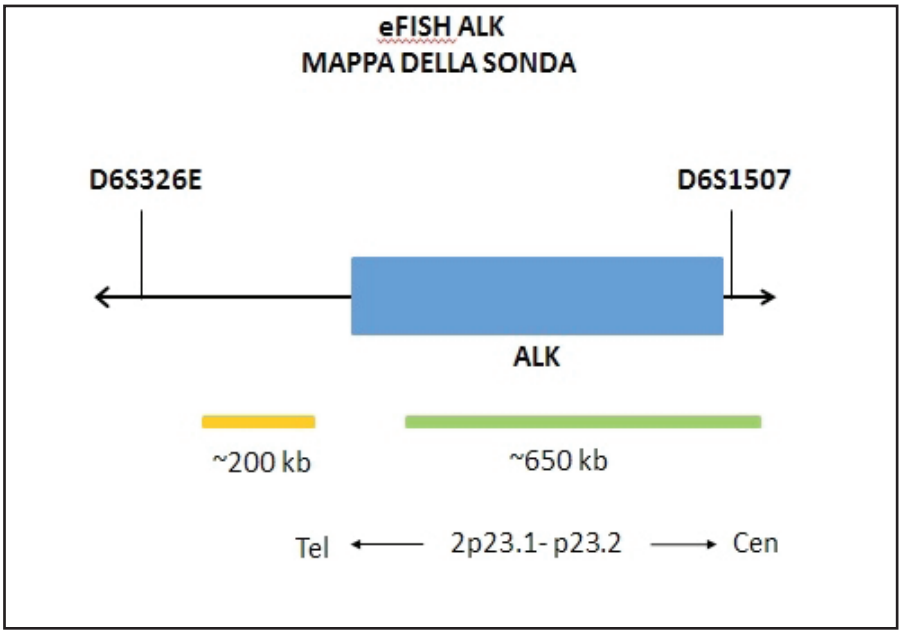


Figura 11. Sonda ROS 1 e sonda ALK .

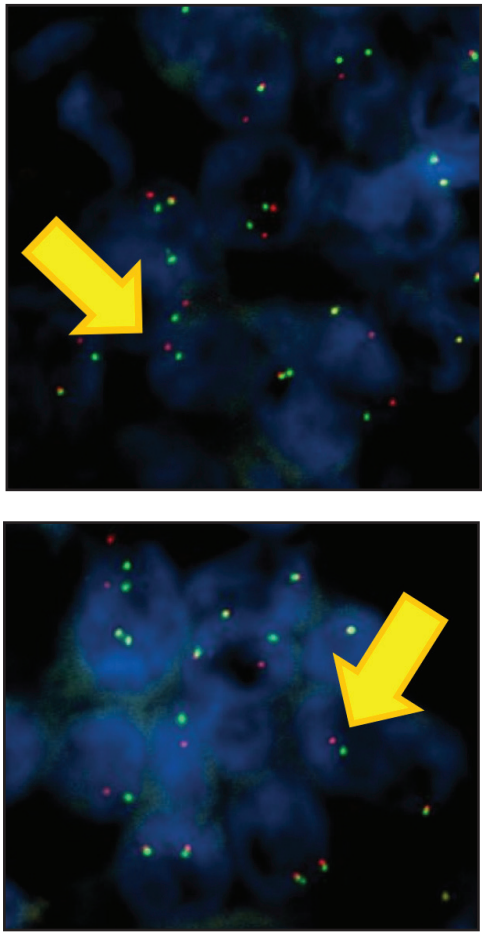


Figura 12. Immagine FISH, ALK positivo indicato dalla freccia.

Protocollo operativo

Un protocollo standard per la metodica FISH prevede due giorni di lavoro.

Sparaffinatura

- riscaldamento dei vetrini in stufa a 60 °C per 2-3 ore;
- immergere i vetrini in xilene (2 passaggi da 10 minuti);

Idratazione

- passaggio in alcol decrescenti 99-95-80-70 (passaggi di 10 minuti ognuno);
- passaggio in acqua distillata (10 secondi);

Pretrattamento termico
- i vetrini, posti in macchina, subiscono una serie di lavaggi in maniera automatica;
- successivamente viene aggiunta manualmente una soluzione dedicata ad una T costante di 89 °C per 30 minuti;
- lavaggio celere con Wash Buffer;

Pretrattamento enzimatico
- aggiunta manuale sui vetrini della Proteasi che viene lasciata agire a 37 °C per 25 minuti;
- lavaggi con Wash Buffer ed Alcol;

Incubazione sonda
- aggiungere manualmente la sonda (circa 6-10 μl) direttamente sul vetrino al buio;
- applicazione automatica del vetrino coprioggetto sopra la sezione;
- avviare il programma over-night di denaturazione ed incubazione sullo strumento;

Lavaggio di stringenza
- rimozione automatica del vetrino coprioggetto;
- lavaggi in macchina a 77 °C con tamponi di stringenza per 10 minuti;
- brevi lavaggi con il Wash Buffer;

Aggiunta DAPI
- la macchina in automatico rimuove il coprioggetto;
- lavaggi con Wash Buffer;
- applicazione manuale del DAPI[1];
- aggiunta automatica del coprioggetto;
- rimuovere i vetrini e sigillarli;
- conservare i vetrini al buio ed a 4 °C per 15 minuti;
- lettura al microscopio a fluorescenza[2].

---

1 Il Dapi è una molecola fluorescente derivata dall'indolo e viene considerato un colorante vitale essendo in grado di oltrepassare la membrana plasmatica intatta, marcando le cellule vive. Utilizzato nell'ultima fase, quella della controcolorazione dei nuclei, ha assorbimento massimo ad UV a 358 nm ed è eccitata a 340-360 nm. In seguito ad eccitazione il Dapi forma dei complessi fluorescenti con il DNA a doppia elica, mostrando una specificità per le coppie di basi A-T, il picco massimo di emissione si ha intorno a 461 nm e la fluorescenza blu emessa consente di poter caratterizzare il nucleo delle cellule colorandoli blu.

2 Dopo l'osservazione questi vetrini potranno essere conservati a -20 °C, poiché la temperatura bassa riduce il deperimento del fluoroforo.

Indagini molecolari

Quanto sin qui detto è stato applicato per l'analisi mutazionale dei geni EGFR, BRAF, ROS 1 e RAS, che viene effettuata nei pazienti affetti da adenocarcinoma del polmone (diversi sono i geni alterati nell'ADC del polmone -Fig.13-).

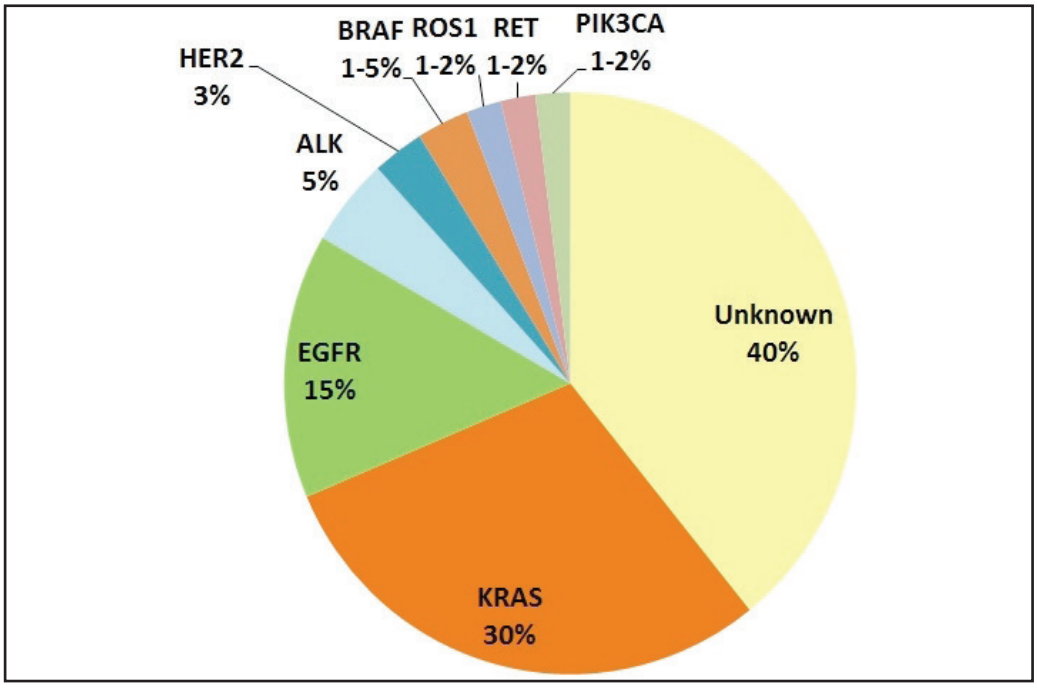


Figura 13. Geni coinvolti nelle neoplasie polmonari e relative percentuali.

La ricerca per la target-therapy fino ad ora ha individuato diversi geni, i più importanti sono: EGFR (*EpidermalGrowthFactorReceptor*) che si trova mutato nel 15% dei pazienti affetti da ADC polmonari, ALK(chinasi del linfoma anaplastico) 5-7%, *KRAS* 20-30% degli ADC polmonari.

Più recentemente, sono state documentate nuove alterazioni molecolari che definiscono in maniera specifica altri sottogruppi di ADC, quali il riarrangiamento del gene *ROS1* (1-2% di ADC).

Più recentemente, sono state documentate nuove alterazioni molecolari che definiscono in maniera specifica altri sottogruppi di ADC, quali il riarrangiamento del gene *ROS1* (1-2% di ADC) e del gene *RET*, mutazioni attivanti di *BRAF* (sia V600E che non-V600E) ed *HER2*, ed ancora amplificazione di *FGFR1*, mutazione di *PI3KCA*, mutazioni di *PTEN*, amplificazione e mutazioni di *PDGFR* e mutazioni di *DDR2*.

Per adesso gli oncologi chiedono le mutazioni dei geni: EGFR, ALK, ROS1, perché solo ad essi è possibile associare una terapia biologica.

Targeted cancer therapies già impiegate nella pratica clinica sono ad esempio:

EGFR i farmaci **Erlotinib, Gefitinib e Afatinib.**

ALK e ROS1 Il farmaco **Crizotinib.**

Vie di trasduzione del segnale

Al fine di individuare i geni coinvolti nelle modifiche neoplastiche si è andato ad osservare il pathway di trasduzione del segnale coinvolto nei vari meccanismi cellulari. La via più spesso coinvolta è quella delle MAP chinasi.

A monte della cascata di trasduzione vi è l'interazione di un ligando con il suo recettore (recettori tirosinchinasici, EGFR). In seguito al legame, ligando-recettore, questi dimerizzano fosforilandosi a vicenda, il che attiva una cascata di reazioni che porta a controllare meccanismi di regolazione della moltiplicazione e del differenziamento cellulare. Di fatti, il dimero che si va a formare, si lega ad una proteina adattatrice Grb2 che a sua volta si lega ad una proteina SOS attivandola. La proteina SOS funziona come interruttore a scambio nucleotidico GDP/GTP il che promuove l'attivazione di RAS che risulta "acceso" quando legato al GTP (l'inattivazione di RAS richiede l'intervento di una proteina che attiva la GTPasi detta GAP). RAS attivato lega a sua volta il dominio N-terminale di RAF (nel nostro caso specifico BRAF) una serin/treoninchinasi, attivandola. BRAF a sua volta lega e fosforila MEK che a sua volta agisce su ERK con un meccanismo analogo. Tali chinasi attivate, traslocano nel nucleo, dove fosforilano i fattori di trascrizione ed innescano meccanismi di proliferazione cellulare. Da ciò si evince come la modificazione di una di queste proteine coinvolte nel pathway cellulare sia implicata nei meccanismi di trasformazione neoplastiche (Fig. 14).

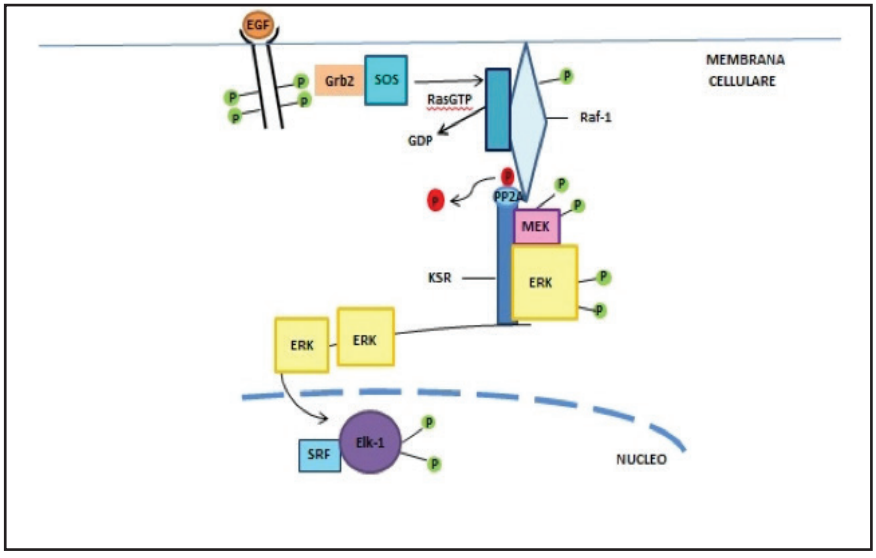


Figura 14. Patway di trasduzione del segnale.

Geni coinvolti

EGFR

Il gene EGFR (Fig.15) è localizzato sul braccio corto del cromosoma 7 alla posizione 12 (7p12).

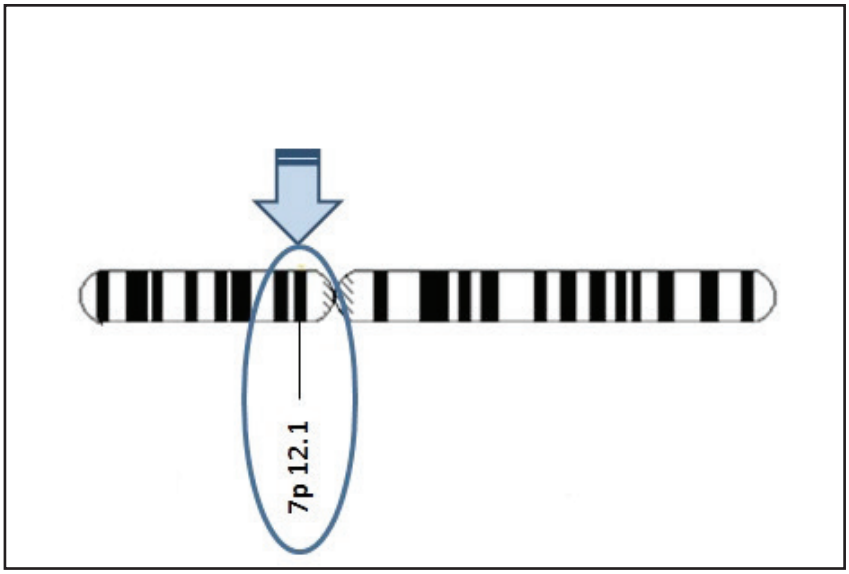


Figura 15. Localizzazione gene di EGFR.

La famiglia di EGFR TK, denominata HER o famiglia ErbB (Human Epidermalgrowthfactor), è un gruppo di proteine di membrana ad attività tirosinchinasica composta da quattro membri, che regolano molti processi fisiologici (modulazione della proliferazione cellulare, dell'apoptosi, della motilità cellulare e della neovascolarizzazione), essendo così in grado di indurre importanti meccanismi legati alla cancerogenesi.

I primi studi hanno dimostrato che le mutazioni di EGFR sono somati-che si osservano più comunemente nei non fumatori, nelle donne, negli adeno-carcinomi e nei pazienti asiatici. La localizzazione delle mutazioni a carico del gene EGFR vede essenzialmente l'interessamento degli esoni 18-19-20-21 (Fig.16) ed in particolar modo la delezione di piccoli tratti dell'esone 19, mutazioni puntiformi dell'esone 21. La mutazione T790M (esone 20), invece,

è una mutazione di resistenza, che raramente si riscontra sin dall'inizio nel campione neoplastico, ma che generalmente insorge successivamente come forma di resistenza nei confronti della terapia in atto. Il rimanente 10% circa delle mutazioni consistono in rare mutazioni missense riscontrabili principalmente nell'esone 18, ma anche 20 e 21. Le mutazioni presentano un'incidenza del 10-15% nei pazienti caucasici con NSCLC, mentre negli asiatici, e in modo particolare nei giapponesi, l'incidenza è nettamente più alta, tra il 30% e il 40%.

Nei pazienti con NSCLC, la presenza di queste mutazioni di EGFR è predittiva di una significativa risposta clinica agli inibitori tirosinchinasici di EGFR (si pensa che queste mutazioni, aumentano l'affinità dell'inibitore per il recettore, rappresentando il meccanismo molecolare alla base dell'efficacia clinica dei TKI).

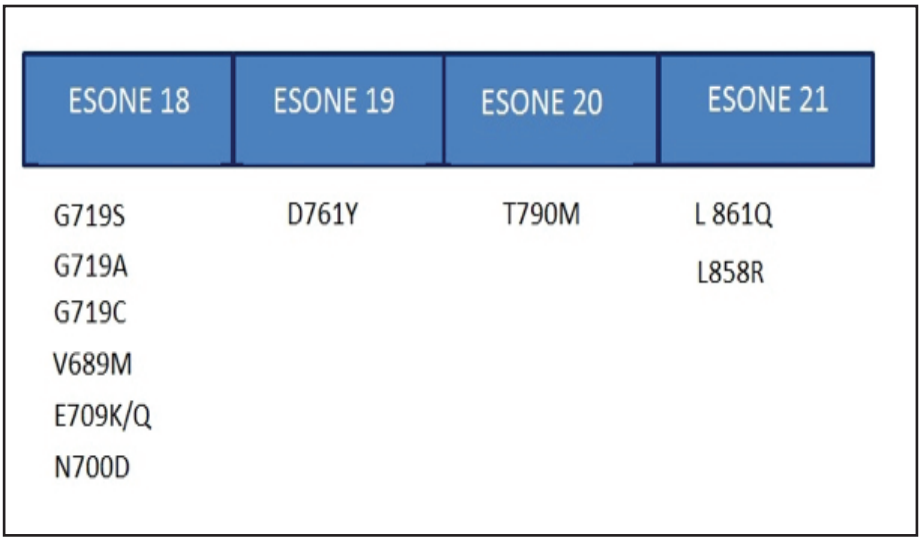


Figura 16. Siti di mutazioni del gene EGFR nei rispettivi esoni. Mutazione più frequente L858R (40-45%) nell'ex 21.

ALK

La proteine ALK (Chinasi del linfoma Anaplastico) è un membro (Fig.17) della superfamiglia dei recettori dell'insulina, recettori tirosinchinasici, e risiede sul cromosoma 2p23 (braccio corto del cromosoma 2 in posizione 23).

ALK è una glicoproteina di membrana di tipo I che normalmente è espressa nel sistema nervoso.

La patogenesi molecolare dell'ALK inizia con distribuzioni cromosomiche che si appaiono con la sequenza di codifica 3′ per il dominio di segnalazione intracellulare con elementi promotori 5′ e sequenze di codifica di altri geni. Un'inversione dell'intera regione del cromosoma 2p, genera la formazione di un prodotto del gene di fusione comprendente porzioni del gene EML4 e del gene ALK.

Questo cambiamento è stato ritrovato nei giovani non fumatori o nei fumatori leggeri. Il riarrangiamento del gene ALK induce la produzione di una proteina anomala che stimola la proliferazione cellulare.

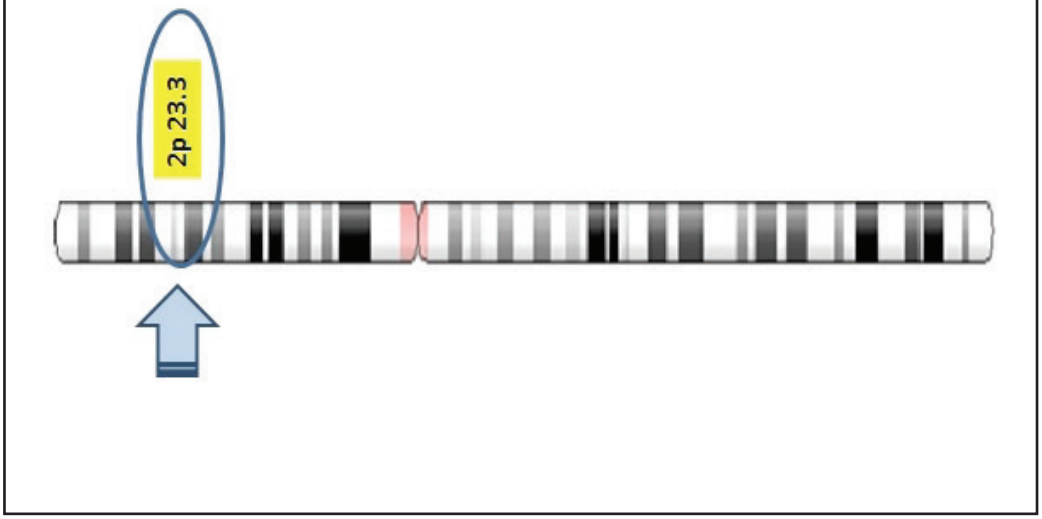


Figura 17. Localizzazione gene del gene ALK.

BRAF

Il gene BRAF (Fig.18) è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7 in posizione 34 (7q34).

Il gene BRAF codifica una proteinchinasi citoplasmatica del tipo serina/treonina implicata nella via di trasduzione del segnale RAS/MAPK e che ha come principale substrato MEK.

Il gene BRAF consta di 18 esoni, ed è suddiviso essenzialmente in tre regioni conservate CR1-CR2-CR3. La maggior parte delle mutazioni del gene BRAF sono state osservate tutte nella regione ad attività chinasica, ed interessano generalmente il punto T1799A, il che va ad attivare un percorso di segnalazione MAPK che porta ad un aumento della proliferazione cellulare e resistenza dell'apoptosi. Altre mutazioni sono state identificate sia nel segmento di attivazione nell'esone 15 che nell'esone 11.

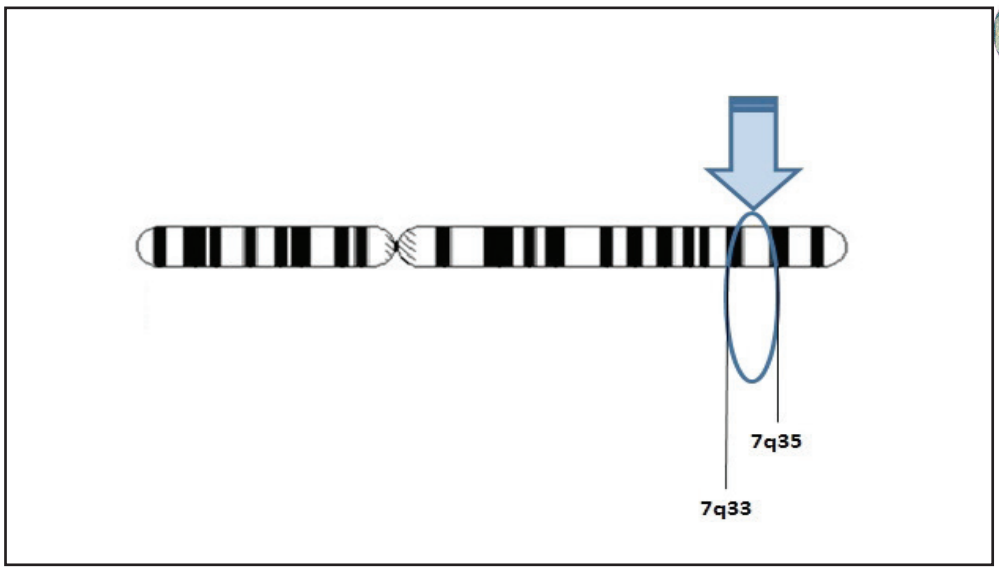


Figura 18. Localizzazione del gene BRAF.

ROS 1

Il gene Ros 1 (Fig. 19) un recettore tirosinchinasico della famiglia dei recettori per l'insulina è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 6 in posizione 22 (6q22).

I riarrangiamenti di tale gene, codificando per una proteina implicata nell'attivazione del patway di crescita e proliferazione cellulare (nei patway di PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT e MAPK/ERK) sono responsabili dell'1-2% dei NSCLC.

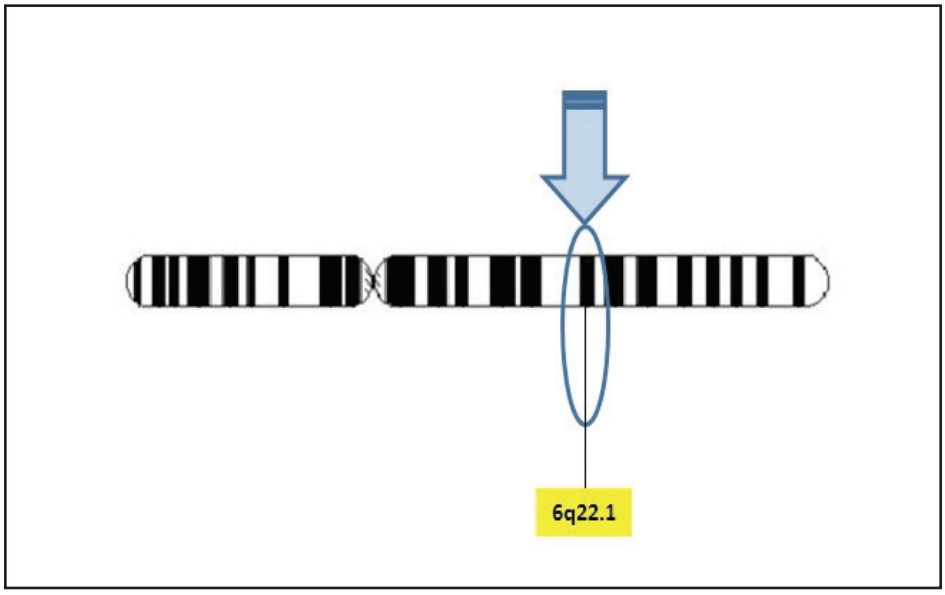


Figura 19. Localizzazione gene di ROS 1.

KRAS - NRAS

Il gene Ras (*Rat sarcoma)* appartiene alla famiglia di geni che codificano per le omonime proteine dette *small GTPase*, che sono proteine G monomeriche, coinvolte nella trasduzione del segnale cellulare (crescita cellulare, differenziazione e sopravvivenza).

L'attivazione di Ras, così come quella di tutte le altre proteine facenti parte della superfamiglia delle GTPasi, è accelerata dal *fattore di scambio dei nucleotidi guaninici* (GEF), il quale si lega a Ras permettendo il distacco del GDP.

Ras lega Raf, che a sua volta fosforila due residui di serina delle proteinchinasi MEK1 e MEK2, chinasi con specificità doppia, capace cioè di fosforilare sia residui di serina che residui di tirosina. Infine, MEK fosforila un'altra serina/treonina chinasi, le MAP chinasi (ERK-1 ed ERK-2), attivandole e la cui azione può mediare numerose risposte cellulari.

I tre geni umani ras codificano proteine molto simili costituite da catene di 188-189 aminoacidi, designate H-Ras, N-Ras e K-Ras4A e K-Ras4B (le due K-Ras proteine derivanti da splicing alternativo).

Il gene KRAS è localizzato sul braccio corto del cromosoma 12 (Fig. 20).

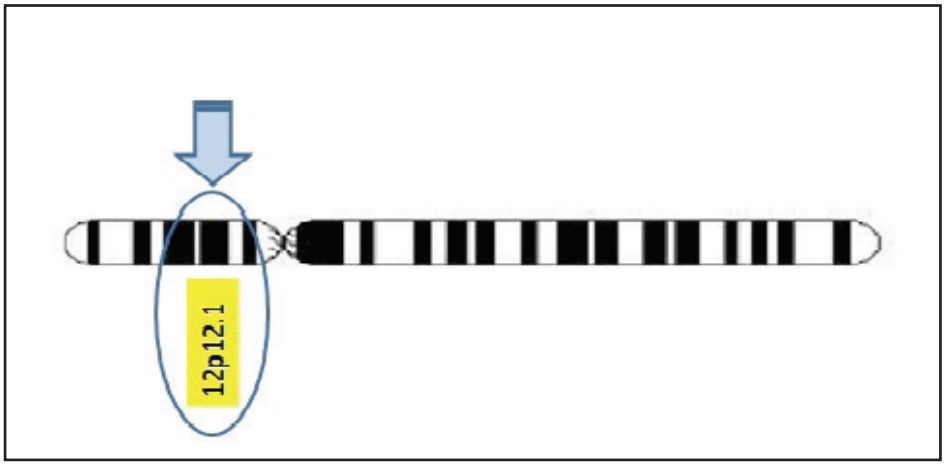


Figura 20. Localizzazione del gene KRAS.

Di questi geni, da cui si hanno proteine con intrinseca attività GTPasi si vanno ad analizzare le mutazioni presenti nei codoni 12,13,59,61, 117 e 146, ovvero mutazioni presenti negli esoni 2,3 e 4.

Il gene NRAS è invece localizzato sul cromosoma 1 (Fig. 21).

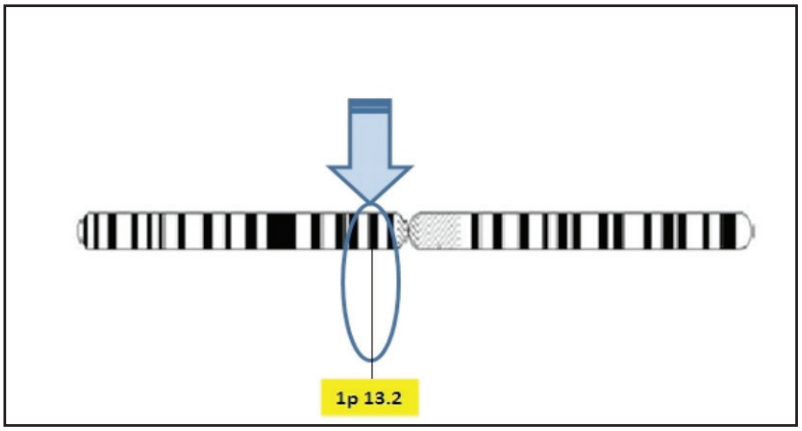


Figura 21. Localizzazione del gene NRAS

Altre tecniche molecolari

Spettrometria di massa

La spettrometria di massa viene utilizzata nelle analisi genetiche per l'elevata sensibilità e per l'analisi di un grande numero di campioni in tempi relativamente brevi. Questo sistema utilizza la tecnologia MALDI-TOF, cioè il desorbimento e la ionizzazione di una matrice assistita da laser e misurando il tempo di volo di cariche elettriche, permettendo, a partire dal DNA, di discriminare due o pù analiti sulla base della loro massa.

Il sistema è costituito da un nanodispensatore, da uno spettrometro di massa e di un software di analisi per ottenere dati di genotipizzazione. È utilizzato nel campo dell'oncologia, per l' epigenetica (studi di metilazione) e per l'espressione genica quantitativa.

La metodica costa di 3 punti:

- Amplificazione
- Estensione dei primer
- Rivelazione e analisi dei dati

Il DNA viene prima estratto dai campioni pervenuti, successivamente amplificato tramite multiplex-PCR per poi subire una reazione SAP (per rimuovere i nucleotidi residui e purificare la reazione). Il successivo step è una reazione di Primer Extension (primer di estensione adiacente ad ogni sito polimorfico e di nucleotidi con massa modificata). In questo modo otteniamo, per ciascun sito polimorfico, uno o più analiti di massa nota.

Le soluzioni ottenute vengono dispensate su un chip da 96 o da 384 pozzetti; a questo punto l' analisi mediante spettrometro di massa genera un picco a massa nota per ciascun analita (ddNTP) che sarà associato ad un genotipo wild-type mutato o eterozigote del campione analizzato.

NGS

La tecnologia di sequenziamento del DNA di nuova generazione (Next Generation Sequencing NGS) ha permesso grazie alla sua velocità, affidabilità e sensibilità, una rivoluzione nella ricerca biologica e medica. Queste

tecnologie permettono di sequenziare in parallelo milioni di frammenti di DNA con elevata precisione, consentendo anche con esigua quantità di DNA di ottenere dati precisi e risolutivi.

Questa moderna tecnologia di sequenziamento si basa principalmente su 4 punti:

- Preparazione delle librerie
- Preparazione dei templati
- Sequenziamento
- Analisi dei dati

Con questa metodica è possibile effettuare il sequenziamento di interi genomi, risequenziamento per analisi di varianti genetiche, analisi di trascrittomi e non-coding RNA, analisi di esoni ed analisi epigenetiche. L'estrema sensibilità dell'NGS permette la sua applicazione in vari campi come nella ricerca di geni d'espressione ed in oncologia.

E' una metodica in continua evoluzione ed è il futuro nel campo della ricerca, ad oggi è utilizzata anche in Anatomia Patologica, dove grazie all'utilizzo di specifici pannelli molecolari permette di evidenziare mutazioni a carico di geni correlati a carcinomi.

Ricerca PDL-1

Oltre la terapia biologica sembra possa esserci di più: l'immunoterapia.

Le cellule cancerogene, spesso, utilizzano sistemi per camuffarsi ed essere identificate dal sistema immunitario come self; ovvero come cellule non pericolose, così da eludere le difese immunitarie.

Si è di fatti scoperta una proteina trans-membrana della famiglia delle immunoglobuline CD28/CTLA-4, chiamataPD-1(PROGRAMMED DEATH-1), che viene espressa sulle cellule del sistema immunitario e sui linfociti attivati precedentemente dall'interazione con l'antigene corrispondente. Tale proteina è dotata di due ligandi, proteine trans-membrana, PD-L1 e PD-L2(PROGRAMMED DEATH-LIGAND) anchesse espresse sulle cellule del sistema immunitario. L'interazione tra PD-1 e PD-L1/2 regola in generale le risposte immunitarie e regola negativamente il signaling delle celulle T (Fig. 22).

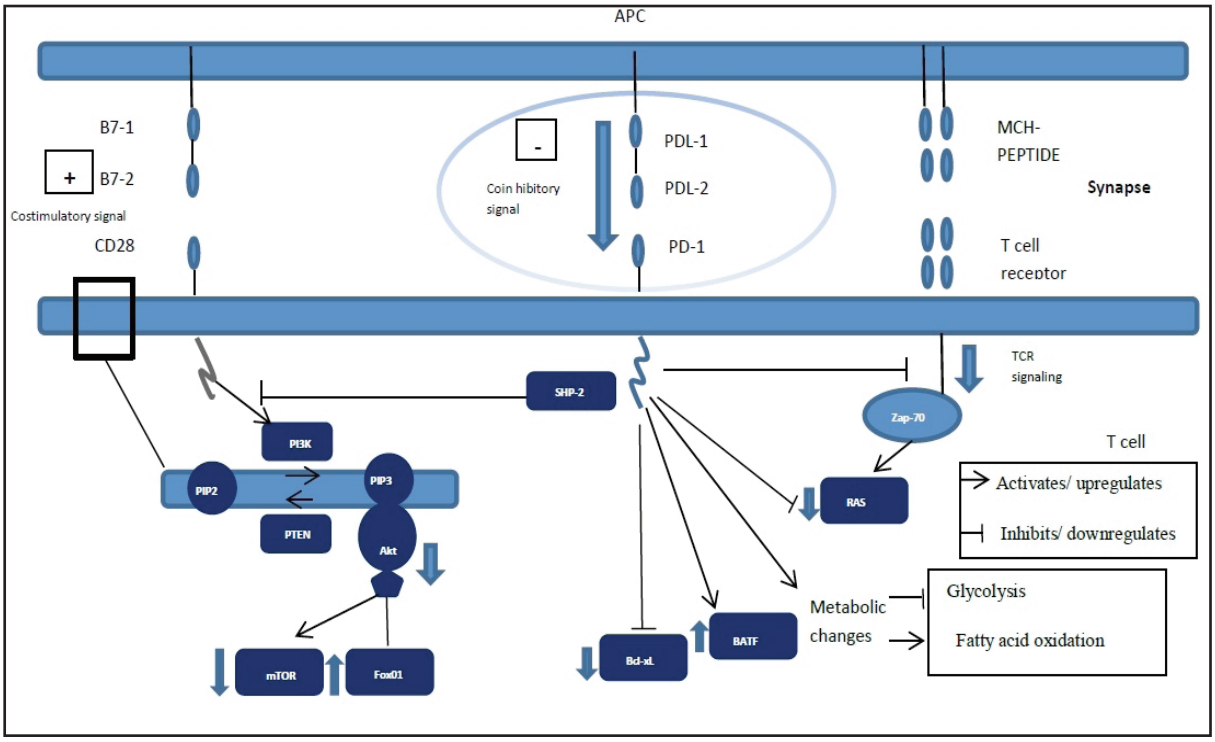


Figura 22. Interazione tra PD1-PDL1/2, signaling delle cellule T.

I tessuti normali raramente esprimono le proteine PD-L1 sulla propria superficie cellulare, ad eccezione delle tonsille, placenta ed una piccola frazione di cellule macrofago-like nei polmoni e fegato, al fine di limitare la propagazione dell'area infiammata ed evitare danni ai tessuti circostanti.

Da qui si è notato che sulla superficie cellulare di vari tipi di tumori (per lo più in quelli solidi) e nello stesso microambiente tumorale, ci possa essere un iper-espressione di PD-L1. L'interazione PD-1/PD-L1 induce immunosoppressione e tolleranza nel microambiente tumorale, con apoptosi, anergia ed esaurimento funzionale delle cellule T e produzione di IL-10. Essi possono anche mediare la soppressione delle cellule dendridiche, indurre la differenziazione di Tregs e proteggere le cellule tumorali da lisi dai linfociti T citotossici (CTL).

Di qui la possibilità dell'immunoterapia, come ad esempio nel caso del polmone, utilizzata per i NSCLC squamosi, che ha come principio di funzionamento l'uso di farmaci che potenziano il nostro sistema immunitario rendendolo in grado di riconoscere e distruggere le cellule cancerogene.

Nel laboratorio di Anatomia Patologica giunge la richiesta da parte dell'oncologo della ricerca di PD-L1 sui NSCLC squamosi, con l'anticorpo 28.8 è possibile valutare anche NSCLC. La ricerca viene effettuata con tecnica IHC sul tessuto per individuare l'espressione della proteina, come unico biomarker per la selezione dei pazienti che possono utilizzare l'immunoterapia. In base al farmaco adottato dall'oncologo, viene utilizzato il clone associato (Fig 23):

- SP 142 per il trattamento con Atezolizumab
- SP 263 per il trattamento con Durvalumab
- PD-L1 22C3 per il trattamento con Pembrolizumab
- PD-L1 28-8 per il trattamento con Nivolumab

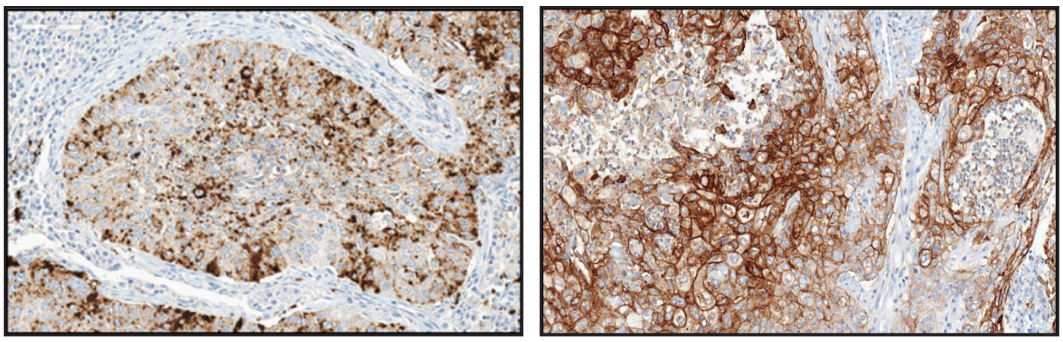


Figura 23. Esempio di positività al clone SP 142 e SP 263. I pazienti potranno usufruire dell'immunoterapia

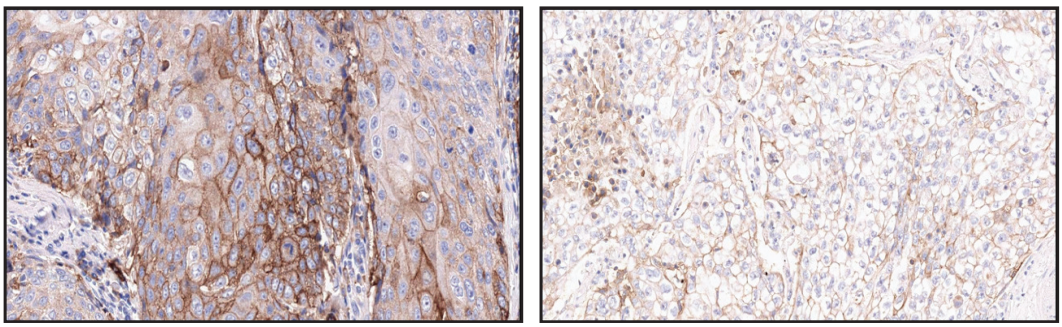


Figura 24. Esempio di positività al clone 28.8 e 22C3. I pazienti potranno usufruire dell'immunoterapia

Conclusioni

Alla luce della diagnostica anatomopatologica del terzo millennio, la figura del patologo molecolare diventa di grande importanza considerata anche la multidisciplinarità.

Il patologo unitamente ai suoi collaboratori tecnici, biologi, biotecnologici, formula diagnosi molecolari che daranno agli oncologi la possibilità di effettuare terapie personalizzate per i pazienti oncologici,che avranno un miglioramento in termini di sopravvivenza e qualità della vita.

Il laboratorio di Patologia Molecolare ha uno scopo diagnostico avvalendosi di sonde specifiche per lo studio molecolare delle malattie linfoproliferative e di alcuni tumori mesenchimali (FISH).

La terapia target permette, grazie allo studio delle sigole mutazioni, l'utilizzo di farmaci diretti solo contro le cellule tumorali limitando i danni alle cellule normali (EGFR, ALK, ROS1 nei tumori NSCLC del polmone, KRAS ed NRAS nei tumori del colon retto e BRAF nel melanoma).

La ricerca di PD-1 e PDL1 apre attraverso tipizzazioni immunoistochimiche le nuove frontiere dell'immunoterapia che utilizza farmaci che potenziano il nostro sistema immunitario rendendolo in grado di riconoscere e distruggere le cellule cancerogene. Q ueste terapie costituiscono un'innovazione e possono rivoluzionare il trattamento di molte forme tumorali.

Il prossimo futuro vedrà l'utilizzo ne l laboratorio di Patologia Molecolare del NGS, sequenziamento del DNA di nuova generazione che grazie alla sua velocità, sensibilità e specificità rappresenterà una rivoluzione nella ricerca biologica e medica.

Alla luce di quanto su detto il patologo avrà un ruolo di estrema centralità in tutto il percorso diagnostico e nella sua ricaduta terapeutica.

Ringraziamenti

Si ringraziano i Dottori Roberta Lucchese, Giampiero Rocco, Mario Taiani ed Adele Vorraro per il loro contributo quotidiano nel Laboratorio di Patologia Molecolare.

Bibliografia

Antonicelli A., Cafarotti S. et al.: EGFR – TargetedTherapy for Non-Small Cell LungCancer: Focus on EGFR OncogenicMutation. Int. J. Med. Sci. 2013; 10 (3): 320-330.

Czuchlewski, Bocklage, Chabot-Richards, Aguilera, Karner: Diagnostic Pathology Molecular Oncology. Amirsys, Elsevier.

L. Caldarola, S. Petroni, A. Scattone, M.A. Caponio, D. Galetta, G. Serio, M. Zambetti, G. Simone, A. Catino: A case of concomitant EGFR mutation and ALK rearrangement. Are these double mutations so rare?. Siapec, June 2015.

Ciardiello F, Tortora G. *N Engl J Med*. 2008; 358:1160-1174. 2008.

Anna Di Leonardo, Corrado Fagnani, Simonetta Pulciani: Applicazioni dei microarray.CaleidoscopioItaliano, 222.

Gillian Ellison, Guanshan Zhu, Alexandros Moulis, Simon Dearden, Georgina
Speake, Rose McCormack: EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumor tissue and cytology samples. JPC Online First, published on November 21, 2012.

Jiabei He, Ying Hu, Mingming Hu &Baolan Li: Development of PD-1/PD-L1 Patway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. Scientific Reports, www.nature.com/scientificreports5:13110 | DOI: 10.1038/srep13110.

Jordan M. Chinai, MuraliJanakiram, Fuxiang Chen, Wantao Chen, Mark Kaplan, and XingxingZang: New immunotherapies targeting the PD-1 patway. CellPress, review, Trends in Pharmacological Science, September 2015, Vol. 36, No.9.

Luigi Ruco, Aldo Scarpa: Anatomia Patologica, Le Basi; Utet Scienze Mediche.

Mendelsohn, Gray, Howley, Israel, Thompson: The molecular Basis of Cancer; Elsevier Saunders.

Nature Medicine 18, 349-351 (2012).

Neal I. Lindeman, Philip T. Cagle, Mary Beth Beasley, DhananjayArunChitale, SanjaDacic, Giuseppe Giaccone, Robert Brian Jenkins, David J. Kwiatkowski, Juan-Sebastian Saldivar, Jeremy Squire, Erik Thunnissen, and Marc Ladanyi: SPECIAL ARTICLE, Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients forEGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors. Elsevier, The Journal of Molecular Diagnostics, Vol.15, No.4, July 2013.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R., et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer by gefitinib. N Engl J Med. 2004; 350:2129-2139.

A.Marchetti, S. Malatesta, L. Felicioni, F. Buttitta: Valutazione delle mutazioni del gene EGFR nel carcinoma polmonare: linee guida ed ultime acquisizioni. Elsevier 2011.

Antonio Marchetti e Nicola Normanno, Raccomandazione per l'analisi mutazionale del gene EGFR nel carcinoma polmonare.

Olayioye MA et al.: The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. Int J Cancer 2006; 118:1426-1429.

Pao W, Chmielecki J.: Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. Nat Rev Cancer. 2010;10:760-774.

Victoria M. Rimkunas, Katherine E. Crosby, Daiqiang Li, Yerong Hu, Meghan E. Kelly, Ting-Lei Gu, Jennifer S. Mack, Matthew R. Silver, Xinmin Zhou, and Herbert Haack: Analysis of Receptor Tyrosine Kinase ROS1-Positive Tumors in Non-Small Cell Lung Cancer: Identification of a FIG-ROS1 Fusion. Clinical Cancer Research, published online first June 1, 2012.

V. Rusch, J. Baselga, C. Cordon-Cardo, J. Orazem, M. Zaman, S. Hoda, J. Mclntosh, J. Kurie, and E. Dmitrovsky: Differential Expression of the Epidermal Growth Factor Receptor and Its Ligandsin

Primary Non-Small Cell Lung Cancers and Adjacent Benign Lung. CANCER RESEARCH 53. 2379-2385. May 15,1993.

Sharma SV et al.: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer 2007; 7 (3): 169-81.

Kengo Takeuchi, Manabu Soda, Yuki Togashi, Ritsuro Suzuki, Seiji Sakata, SatokoHatano, ReimiAsaka, WakakoHamanaka, Hironori Ninomiya, Hirofumi Uehara, Young Lim Choi, Yukitoshi Satoh, Sakae Okumura, Ken Nakagawa, Hiroyuki Mano, & Yuichi Ishikara: RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. Nature medicine, vol.18, No.3, March 2012.

Xiaozhu Zhang, Alex Chang: Somatic mutations of the epidermal growth factor receptor and non-small-cell lung cancer. Jmedgenet, review, published online 8 December 2006.

Xinbing Sui, Junhong Ma, Weidong Han, Xian Wang, Yong Fang, Da Li, Hongming Pan and Li Zhang: The anticancer immune response of anti-PD-1/PD-L1 and the genetic determinants of response to anti-PD-1/PD-L1 antibodies in cancer patients. Oncotarget, Vol.6, No.23, www.impactjournals.com/oncotarget.

Aiom, linee guida Neoplasie del polmone. Ed.2014.

Thomas RK et al. (2007) High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. Nat Genet 39

MacConaill LE et al. (2009) Profiling Critical Cancer Gene Mutations in Clinical Tumor Samples. PLoS ONE 4(11)

National Cancer Institute and National Human Genome Research Institute. The Cancer Genome Atlas. http://cancergenome.nih.gov/

National Cancer Institute and the National Institutes of Health. "Targeted Cancer Therapies" Fact Sheet. http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/targeted

Sequenom Inc. "Mutation profiling in tumor samples using the Sequenom OncoCarta Panel" Application Note. Nature Methods, June 2009

Velizheva NP, Rechsteiner MP, Wong CE, Zhong Q, Rössle M, Bode B, Moch H, Soltermann A, Wild PJ, Tischler V: Cytology smears as excellent starting material for next-generation sequencing-based molecular testing of patients with adenocarcinoma of the lung.

Bonfiglio S, Vanni I, Rossella V, Truini A, Lazarevic D, Dal Bello MG, Alama A, Mora M, Rijavec E, Genova C, Cittaro D, Grossi F, Coco S: Performance comparison of two commercial human whole-exome capture systems on formalin-fixed paraffin-embedded lung adenocarcinoma samples.

Sitografia

www.AutoGenomics.com

www.cancerressarchuk.org/cancer-info/cancerstats/types/lung/incidence/uk-lung-cancer-incidedence-statistics-geog

http://ghr.nlm.nih.gov/gene/EGFR

https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ALK#location

http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BRAF

http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ROS1

http://ghr.nlm.nih.gov/gene/KRAS

http://ghr.nlm.nih.gov/gene/NRAS

http://biogenex-dev.null.by/international/applications/fish/efish-probes/oncology-probes/ros1-dual-color-break-apart-probe-2984.html

www.impactjournals.com/oncotarget

www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/

www.nature.com/scientificreports

Indice

Editoriale ... » 3
Premessa ... » 5
Introduzione ... » 6
Pre-analitica e tracciabilità ... » 9
Casistica ospedale Monaldi ... » 10
Casi e tecniche ... » 11
Estrazione DNA ... » 16
PCR Real-Time ... » 17
Analisi con microarray ... » 19
Metodica FISH ... » 21
Indagini molecolari ... » 25
Vie di trasduzione del segnale ... » 27
Geni coinvolti ... » 28
EGFR ... » 28
ALK ... » 30
BRAF 1 ... » 31
ROS 1 ... » 32
KRAS – NRAS ... » 33
Altre tecniche molecolari ... » 35
Spettrometria di massa ... » 35
NGS ... » 35
Ricerca PDL-1 ... » 36
Conclusioni ... » 39
Ringraziamenti ... » 39
Bibliografia ... » 40
Sitografia ... » 43
Indice ... » 44

Caleidoscopio *Italiano*

...il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesità.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaiò85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La β-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico e fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**

32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: ***Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: ***La fecondazione*** **in vitro. Maggio '88.**
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno '88.**
36. Baccini C.: ***Le droghe d'abuso (2).*** **Luglio '88.**
37. Piantino P., Pecchio F.: ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre '88.**
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio '89.**
39. Sommariva D., Branchi A.: ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. Butturini U., Butturini A.: ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. Palleschi G.: ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. Fanetti G.: ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. Contu L., Arras M.: ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: ***L'immunologia del diabete mellito.*** **Marzo '90.**
50. Cappi F.: ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio.*** **Aprile '90.**
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: ***I micobatteri.*** **Maggio '90.**
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: ***Anticorpi antinucleo.*** **Giugno '90.**
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. Goracci E., Goracci G.: ***Gli allergo-acari.*** **Agosto '90.**
55. Rizzetto M.: ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: ***Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali.*** **Ottobre '90.**
57. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
58. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbraio '91.**
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. Bedarida G., Lizioli A.: ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. Romano L.: ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. Dondero F. e Lenzi A.: ***L'infertilità immunologica.*** **Giugno '91.**
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: ***Gli Oncogèni.*** **Luglio '91.**
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: ***Infezione-malattia da HIV in Africa.*** **Agosto '91.**
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: ***L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.*** **Settembre '91.**
66. Gentilomi G.A.: ***Sonde genetiche in microbiologia.*** **Ottobre '91.**
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: ***Le sonde di DNA e la virulenza batterica.*** **Gennaio '92.**
68. Zilli A., Biondi T.: ***Il piede diabetico.*** **Febbraio '92.**

69. Rizzetto M.: ***L'epatite Delta.*** **Marzo '92.**
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: ***Gli screening neonatali.*** **Aprile '92.**
71. Tavani A., La Vecchia C.: ***Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari.*** **Luglio '92.**
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: ***L'ormone della crescita.*** **Agosto '92.**
73. Contu L., Arras M.: ***Molecole di membrana e funzione immunologica (I).*** **Settembre '92.**
74. Ferrara S.:*Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: ***Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*****. Novembre '92.**
76. Ferrara S.: ***Manuale di laboratorio II*****. Gennaio '93.**
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: ***Ipertensione Arteriosa.*** **Febbraio '93.**
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: ***I linfomi non Hodgkin.*** **Marzo '93.**
79. Arras M., Contu L.: ***Molecole di membrana e funzione immunologica (II).*** **Aprile '93.**
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: ***Terapia antiretrovirale*****. Maggio '93.**
81. Rizzetto M.: ***L'epatite C*****. Settembre '93.**
82. Andreoni S.: ***Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*****. Ottobre '93.**
83.Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: ***Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow.*** **Novembre '93.**
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: ***Chemiluminescenza.*** **Dicembre '93.**
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: ***Applicazioni degli esami immunologici*****. Gennaio 94.**
86. Arras M., Contu L.: ***Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I lnfociti B*****. Febbraio '94.**
87. Rossetti R.: ***Gli streptoccocchi beta emolitici di gruppo B (SGB).*** **Marzo '94.**
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: ***Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*****. Aprile '94.**
89. Fanetti G.: ***Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*****. Settembre '94.**
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: ***Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*****. Ottobre '94.**
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: ***Helicobacter pylori*****. Novembre '94.**
92. Parazzini F.: ***L'epidemiologia della patologia ostetrica*****. Febbraio '95.**
93. Proietti A., Lanzafame P.: ***Il virus di Epstein-Barr*****. Marzo '95.**
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: ***Immunoflogosi nell'asma bronchiale*****. Maggio '95.**
95. Manduchi I.: ***Steroidi*****. Giugno '95.**
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: ***Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*****. Luglio '95.**
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: ***Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*****. Ottobre '95.**
98. La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: ***Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*****. Dicembre '95.**
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: ***Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*****. Gennaio '96.**
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: ***Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*****. Marzo '96.**
101. Cogato I. Montanari E.: ***La Sclerosi Multipla*****. Aprile '96.**
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.:

***Malattie a trasmissione sessuale*. Maggio '96.**

103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.

104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.

105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative*. Ottobre '96.

106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.

107. Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*. Dicembre '96.

108. Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*. Gennaio '97.

109. Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*. Febbraio '97.

110. Meisner M.: *Procalcitonina*. Marzo '97.

111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2)*. Aprile '97.

112. Palleschi G. Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina*. Maggio '97.

113. Valtriani C., Hurle C.: *Citofluorimetria a flusso*. Giugno '97.

114. Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: *Alcol e problemi correlati*. Settembre '97.

115. Piccinelli M.: *Depressione Maggiore Unipolare*. Ottobre '97.

116. Pepe M., Di Gregorio A.: *Le Tiroiditi*. Novembre '97.

117. Cairo G.: *La Ferritina*. Dicembre '97.

118. Bartoli E.: *Le glomerulonefriti acute*. Gennaio '98.

119. Bufi C., Tracanna M.: *Computerizzazione della gara di Laboratorio*. Febbraio '98.

120. National Academy of Clinical Biochemistry: *Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide*. Marzo '98.

121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: *L'ansia*. Aprile '98.

122. Cinco M.: *La Borreliosi di Lyme*. Maggio '98.

123. Giudice G.C.: *Agopuntura Cinese*. Giugno '98.

124. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (1)*. Luglio '98.

125. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Basofili*. Settembre '98.

126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: *Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo 1*. Novembre '98.

127. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (1I)*. Dicembre '98.

128. Muzi P., Bologna M.: *Tecniche di immunoistochimica*. Gennaio '99.

129. Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*. Febbraio '99.

130. Castello G., Silvestri I.:*Il linfocita quale dosimetro biologico*. Marzo '99.

131. AielloV., Caselli M., Chiamenti C.M.: *Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correlata*. Aprile '99.

132. Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: *Medicina Termale e Malattie Reumatiche*. Maggio '99.

133. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Eosinofili*. Giugno '99.

134. Fusco A., Somma M.C.: *NSE (Enolasi Neurono-Specifica)*. Luglio '99.

135. Chieffi O., Bonfirraro G., Fimiani R.: *La menopausa*. Settembre '99.

136. Giglio G., Aprea E., Romano A.: *Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi*. Ottobre '99.

137. Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: ***Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati.*** **Novembre '99.**
138. Giovanella L.: ***Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica*****. Dicembre '99.**
139. Paladino M., Cerizza Tosoni T.: ***Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management*****. Gennaio 2000.**
140. La Vecchia C.: ***Come evitare la malattia*****. Febbraio 2000.**
141. Rossi R.E., Monasterolo G.: ***Cellule dendritiche*****. Marzo 2000.**
142.Dammacco F.: ***Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I).*** **Aprile 2000.**
143. Dammacco F.: ***Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II).*** **Maggio 2000.**
144. Croce E., Olmi S.: ***Videolaparoscopia.*** **Giugno 2000.**
145. Martelli M., Ferraguti M.: ***AllergoGest.*** **Settembre 2000.**
146. Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: ***TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici.*** **Gennaio 2001.**
147. Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: ***L'umanizzazione dei servizi sanitari*****. Febbraio 2001.**
148. Giovanella L.: ***I tumori della tiroide*****. Marzo 2001.**
149. Dessì-Fulgheri P., Rappelli A.: ***L'ipertensione arteriosa*****. Aprile 2001.**
150. The National Academy of Clinical Biochemistry: ***Linee guida di laboratorio per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico*****. Settembre 2001.**
151. Dominici R.: ***Riflessioni su Scienza ed Etica*****. Ottobre 2001.**
152. Lenziardi M., Fiorini I.: ***Linee guida per le malattie della tiroide*****. Novembre 2001.**
153. Fazii P.: ***Dermatofiti e dermatofitosi*****. Gennaio 2002.**
154. Suriani R., Zanella D., Orso Giacone G., Ceretta M., Caruso M.: ***Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica*****. Febbraio 2002.**
155. Trombetta C.: ***Il Varicocele.*** **Marzo 2002.**
156. Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: ***Ambiente e polmone*****. Aprile 2002.**
157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: I ***Markers tumorali.*** **Maggio 2002.**
158. Loviselli A., Mariotti S.: ***La Sindrome da bassa T3*****. Giugno 2002.**
159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giacone G.: ***Helicobacter Pylori: stato dell'arte.*** **Ottobre 2002.**
160. Canini S.: ***Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato.*** **Novembre 2002.**
161. Atzeni M.M., Masala A.: ***La β-talassemia omozigote*****. Dicembre 2002.**
162. Di Serio F.: ***Sindromi coronariche acute*****. Gennaio 2003.**
163. Muzi P., Bologna M.: ***Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario*****. Febbraio 2003.**
164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: ***Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche*****. Marzo 2003.**
165. Magrì G.: ***Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico*****. Aprile 2003.**
166. Rapporto dello Hastings Center: ***Gli scopi della medicina: nuove priorità.*** **Maggio 2003.**
167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: ***Il sonno e le sue alterazioni*****. Giugno 2003.**
168. Macchia V., Mariano A.: ***Marcatori tumorali nel cancro della vescica*****. Luglio 2003.**
169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: ***La Turbercolosi Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*****. Agosto 2003.**

170. Aebischer T.: ***Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario*****. Settembre 2003.**
171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: ***Il manuale della sicurezza*****. Ottobre 2003.**
172. Canigiani S. e Volpini M.: ***Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione*****. Novembre 2003.**
173. La Brocca A. Orso Giacone G. Zanella D. Ceretta M.: ***Laboratorio e clinica delle principali affezioni tiroidee*****. Dicembre 2003.**
174. Savron G.: ***Le Fobie*****. Gennaio 2004.**
175. Paganetto G.: ***Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chimica ambientale*****. Febbraio 2004.**
176. Giovanella L.: ***Iperparatiroidismo e tumori paratiroidei*****. Marzo 2004.**
177. Severino G., Del Zompo M.: ***Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata".*** **Aprile 2004.**
178 Arigliano P.L.: ***Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie.*** **Maggio 2004.**
179. Bruni A.: ***Malattia di Alzheimer e Demenza Frototemporale.*** **Giugno 2004.**
180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dallera M.: ***Eziopatogenesi e diagnostica allergologica.*** **Luglio 2004.**
181. Franzoni E., Gualandi P. Pellegrini G.: ***I disturbi del comportamento alimentare.*** **Agosto 2004.**
182. Grandi G., Peyron F.: ***La toxoplasmosi congenita*****. Settembre 2004.**
183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A: ***Patogeni emergenti e resistenze batteriche*****. Ottobre 2004.**
184. Tosello F., Marsano H.: ***Scientific English Handout*****. Novembre 2004.**
185. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D.: ***Ipertensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*****. Dicembre 2004.**
186. Paganetto G.: ***Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche*****. Gennaio 2005.**
187. Savron G.: ***La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette*****. Febbraio 2005.**
188. Magrì G., Baghino E., Floridia M., Ghiara F.: ***Leishmania.*** **Marzo 2005.**
189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., PasinaL.: ***Invecchiamento, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*****. Aprile 2005.**
190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: ***Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili*****. Maggio 2005.**
191. Mazzarello M.G., Albalustri G., Audisio M., Perfumo M., L. Cremonte G.: ***Aerobiologia ed allergopatie*****. Giugno 2005.**
192. Scalabrino G., Veber D., Mutti E.:*Nuovi orizzonti biologici per la vitamina B12***. Luglio 2005.**
193. Zepponi E.: ***Guida pratica per gli utenti del laboratorio analisi*****. Settembre 2005.**
194. Faricelli R., Esposito S., Martinotti S.: ***La sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi.*** **Ottobre 2005.**
195. Baccini C., Bezzi F., Conti M., Tazzari V.: ***Doping e antidoping nello sport*****. Novembre 2005.**
196. Lozzi M.: ***La Mediazione pacifica dei conflitti. Una risorsa socio-relazionale in ambito medico-sanitario*****. Dicembre 2005.**
197. Bracco G.: ***Progettare un Laboratorio di Analisi*****. Gennaio 2006.**

198. Angelucci A.: ***Apoptosi e sistema immunitario: regolazione e patologie associate*****. Febbraio 2006.**
199. Commissione Tecnica sul Rischio Clinico: ***Risk management in Sanità. Il problema degli errori*****. Marzo 2006**
200. Casati G., Marchese E., Roberti V., Vichi M.C.: ***La gestione dei processi clinico assistenziali per il miglioramento delle prassi*****. Aprile 2006.**
201. Zanella D., Ceretta M., Orso Giacone G.: ***Peptidi natriuretici: nuove frontiere in cardiologia?*** **Maggio 2006.**
202. Cicala M., Dal Lago U., Vinci P., Maggiorotti M.: ***L'accusa di malpractice in ambito medico*****. Giugno 2006.**
203. Martino R.: ***Manuale Qualità UNI EN ISO 9001*****. Luglio 2006.**
204. Mazzarello M.G., Arata M., Perfumo M., Marchese A., Debbia E.A.: ***Tubercolosi e micobatteri*****. Settembre 2006.**
205. Matrullo R.: ***Anoressia: la negazione della sessualità come difesa narcisistica*****. Ottobre 2006.**
206. Crotti D.: ***Le parassitosi intestinali ed uro-genitali*****. Novembre 2006.**
207. Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: ***Il referto interpretativo in infettivologia*****. Dicembre 2006.**
208. Baghino E., Magrì G., Nicoletti L., Novaro G., Vignale C., Mazzei C.: ***Stato dell'arte delle aneuploidie fetali, dall'indagine clinica prenatale alla diagnosi anatomopatologica*****. Gennaio 2007.**
209. Mazzarello M.G., Brunetti R., Perfumo M., Torriglia A.M., Montresor G.: ***Principali Tecniche Analitiche in uso nei Laboratori di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche*****. Febbraio 2007.**
210. Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: ***Celiachia dalla A alla Z*****. Marzo 2007.**
211. Cingolani M., Sparviero E.: ***Decidere ora per allora: il testamento biologico (dichiarazioni anticipate di trattamento). Aprile 2007.***
212. Barletta G., Pastacaldi V., Peracino A.P.: ***La misura dei processi nella medicina di laboratorio*****. Maggio 2007.**
213. Rassu S., Masia L., Delussu P., Chessa P., Demartis M.G., Moroso G.: ***Manuale per il supporto vitale di base e la defibrillazione precoce (BLS-D)*****. Giugno 2007.**
214. Anchisi R., M. Gambotto Dessy: ***Il Burnout del personale sanitario*****. Marzo 2008.**
215. Gulletta E., Orrico F., Foti D.P.: ***Clinical Governance nel Laboratorio Biomedico*****. Aprile 2008.**
216. Rochira V., Scaltriti S., Zirilli L., Carani C.: ***Il ruolo degli estrogeni nel maschio*****. Maggio 2008.**
217. Gulletta E., Foti D.P., Corsi M.M., Galliera E.: ***Citochine e Chemochine*****. Giugno 2008.**
218. Zambotto F.M.: ***La biotecnologia transgenica utilizzata nella produzione degli alimenti di origine vegetale*****. Settembre 2008**
220. Morra A., Odetto L., Bozza C., Bozzetto P., Agostinis S., Bariona M.: ***Compendio di Medicina delle Grandi Emergenze*****. Novembre 2008**
221. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: ***I Microarray*****. Dicembre 2008**

222. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: *Applicazioni dei microarray (1)*. **Marzo 2009**

223. Di Lonardo A., Fagnani C., Pulciani S.: ***Applicazioni dei microarray (2)***. **Giugno 2009**

224. Di Carlo A., Mariano A., Macchia V.: ***Struttura e Funzioni delle Matrix Metallo-Proteinasi (MMPs)***. **Settembre 2009**

225. Torricelli F. Giuliani C.: ***Farmacogenetica: aspetti diagnostici, applicazioni cliniche e prospettive future***. **Febbraio 2010.**

226. Montagnana M., Lippi G., Salvagno G.L, Guidi G.C.: ***Vecchi e nuovi marcatori di Sindrome Coronarica Acuta. "Ischemia Modified Albumin": Storia di un marcatore "cardiaco".*** **Marzo 2010.**

227. Coghe F., Coni P., Orrù G., Gavino G.: ***Determinazione molecolare del KRas.*** **Giugno 2013.**

228. Tozzoli R., D'Aurizio F.: ***L'Immunochemiluminescenza nella Diagnostica di Laboratorio.*** **Gennaio 2014.**

229 Giavarina D.: ***Evidence Based Medicine: impiego dei test di laboratorio.*** **Luglio 2014.**

230 Fiore E., Latrofa F., Provenzale M. A., Vitti P.: ***Tiroidite Cronica Autoimmune.*** **Settembre 2014.**

231. Crapanzano C.: ***Vitamina D.*** **Ottobre 2014.**

232. Pulcinelli F. M., Maltese T., Temperilli F.: ***Piastrine, farmaci antiaggreganti e metodiche di laboratorio.*** **Aprile 2015.**

233. Testino G., Florio A., Balbinot P.: ***Le patologie alcol correlate.*** **Settembre 2015.**

234. Dall'Olio G., Fortunato A.: ***Il laboratorio nella diagnosi di gravidanza.*** **Ottobre 2015**

235. Zanella D., Mazzucco D., Grosso S., Serra A.M.: ***Aspetti clinici di appropriatezza diagnostica nella diagnosi differenziale dei disordini intestinali "IBS like"*****: Marzo 2016.**

236. La Gioia A., Rocco V., Balboni F., Fiorini F. e Pezzati P.: ***La diagnostica morfologica delle anemie*****. Ottobre 2016.**

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 34, numero 237

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Tel. mobile 338 2202502
E-mail: sergiorassu@yahoo.it

Responsabile Ufficio Acquisti
Giusi Cunietti

Servizio Abbonamenti
Laura Cecchi

Progettazione e Realizzazione

Restless Architect
of Human Possibilities s.a.s.

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Maria Speranza Giola

EDITORE

...il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Telefax 010/8340310- 809070.
Internet URL: http://www.medicalsystems.it

Stampa
Tipolitografia Nuova ATA
Via Gelasio Adamoli, 281 - Genova
Tel. 010 513120 - Fax 010 503320 - info@nuovaata.com - www.nuovaata.com

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989
Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Dicembre 2016
Sped. in Abb. Post. 45%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.