

INTRODUZIONE.....	4
CAPITOLO 1:.....	5
GENETICA DELLE IMMUNOGLOBULINE E DEL T-CELL RECEPTOR	5
1.1 INTRODUZIONE	5
1.2 LA RISPOSTA IMMUNITARIA	6
1.3 STRUTTURA MOLECOLARE DELLE IG E DEL TCR.....	8
1.3.1 <i>Immunoglobuline (Ig)</i>	8
1.3.2 <i>TCR</i>	10
1.4 ORGANIZZAZIONE DEI GENI DELLE IG E DEL TCR.....	12
1.4.1 <i>Immunoglobuline</i>	14
1.4.2 <i>TCR</i>	15
1.5 LA DIVERSITÀ IMMUNITARIA.....	16
1.5.1 <i>Ricombinazione somatica (Riarrangiamento V(D)J)</i>	17
1.5.2 <i>Diversità combinatoria</i>	21
1.5.3 <i>Diversità giunzionale</i>	23
1.5.4 <i>Diversità somatica (Maturazione dell'affinità)</i>	27
CAPITOLO 2:.....	30
DIAGNOSI E MONITORAGGIO MOLECOLARE DELLE NEOPLASIE	
LINFOPROLIFERATIVE	30
2.1 INTRODUZIONE	30
2.2 UTILIZZO DELLE TECNICHE MOLECOLARI NELLA DIAGNOSI	
DELLE NEOPLASIE LINFOPROLIFERATIVE.....	30
2.2.1 <i>Ricerca della clonalità</i>	33
2.2.2 <i>Traslocazioni cromosomiche</i>	34
2.2.3 <i>Malattia Residua Minima (MRM)</i>	38
2.3 LA PCR NELLA DIAGNOSI E NEL MONITORAGGIO DELLE	
NEOPLASIE LINFOPROLIFERATIVE	40
2.3.1 <i>Amplificazione dei riarrangiamenti genetici dei recettori antigene-specifici</i>	
<i>tramite PCR</i>	43
2.3.2 <i>Limiti della PCR nella valutazione della clonalità e della MRM</i>	48
CAPITOLO 3:.....	51
I RIARRANGIAMENTI GENICI CLONALI DEI RECETTORI ANTIGENE-	
SPECIFICI NELLE NEOPLASIE LINFOPROLIFERATIVE CANINE	51
3.1 INTRODUZIONE	51
3.2 IDENTIFICAZIONE DEI PRIMER CONSENSO PER LA RICERCA	
DELLA CLONALITÀ NELLE NEOPLASIE LINFOIDI B CANINE.....	52
3.3 IDENTIFICAZIONE DEI PRIMER PER L'AMPLIFICAZIONE	
GENICA DEL TCR.....	54

3.4 SENSIBILITÀ DELLA PCR NELLA VALUTAZIONE DELLA CLONALITÀ DEI RIARRANGIAMENTI GENICI DEI RECETTORI ANTIGENE-SPECIFICI NELLE NEOPLASIE LINFOPROLIFERATIVE CANINE.....	55
3.5 SPECIFICITÀ DELLA PCR NELLA VALUTAZIONE DELLA CLONALITÀ DEI RIARRANGIAMENTI GENICI DEI RECETTORI ANTIGENE-SPECIFICI NELLE MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE CANINE.....	59
3.6 DETERMINAZIONE DELLA LINEA DI ORIGINE DELLE NEOPLASIE LIFOIDI MEDIANTE SCOPERTA DEI RIARRANGIAMENTI GENICI DEI RECETTORI ANTIGENE-SPECIFICI.	61
SPERIMENTAZIONE	63
PREMESSA	63
CAPITOLO 4:	64
MATERIALI E METODI	64
PARTE I: DIAGNOSI MOLECOLARE DI LINFOMA	64
4.1 INTRODUZIONE.....	64
4.3 MATRICI	65
4.4 ESTRAZIONE DEL DNA	65
4.5 PCR.....	66
4.5.1 Primer di controllo C_{μ} : adeguatezza dell'estrazione del DNA.....	66
4.5.2 Primer per i linfomi B.....	66
4.5.3 Primer per i linfomi T.....	67
4.5.4 Reagenti	68
4.5.5 Miscele di reazione.....	68
4.5.6 Protocollo di amplificazione	69
4.5.7 Separazione elettroforetica e visualizzazione	70
4.5.8 Prodotti di reazione	70
4.6 ANALISI DI FRAMMENTO	71
4.6.1 Prodotti di reazione dell'analisi di frammento.....	71
4.7 FLUSSO DI LAVORO.....	71
4.7.1 Validazione della PCR.....	72
4.7.2 Validazione della rilevazione dei prodotti PCR con elettroforesi capillare .	73
4.7.3 Prova linfomi T.....	74
4.8 INTRODUZIONE.....	75
4.9 MATRICI E CRITERI DI INCLUSIONE	76
4.9.1 Prova Sperimentale 1	76
4.9.2 Prova Sperimentale 2	76
4.10 ESTRAZIONE DEL DNA	77
4.10.1 Prova Sperimentale 1	77

4.10.2 Prova Sperimentale 2	77
4.11 PCR PROVA SPERIMENTALE 1	77
4.12 PCR PROVA SPERIMENTALE 2.....	78
4.12.1 Primer.....	78
4.12.2 Validazione della PCR emi-nested.....	79
4.13 VISUALIZZAZIONE DEI RISULTATI.....	79
4.13.1 Prova sperimentale 1.....	79
4.13.2 Prova Sperimentale 2	79
CAPITOLO 5:.....	80
RISULTATI	80
PARTE I: DIAGNOSI MOLECOLARE DI LINFOMA	80
5.1 PREMESSA.....	80
5.2 SELEZIONE DEI CASI	80
5.3 CONTROLLO DNA.....	80
5.4 RISULTATI DELLE PROVE DI VALIDAZIONE DELLA PCR DIAGNOSTICA: SCELTA DEI PRIMER	81
5.5 ANALISI DI FRAMMENTO	82
5.5.1 Prova 5 sani/5iperplastici/5 linfomi.....	82
5.5.2Analisi di frammento dei 96 campioni patologici: ricerca della clonalità B.	84
5.5.3 Ricerca della clonalità con primer Gazza/Cb2 modificato	89
5.5.4 Ricerca della clonalità T.....	90
PARTE II: PROGnosi MOLECOLARE DI LINFOMA	92
5.6 PROVA SPERIMENTALE 1: MONITORAGGIO DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA MEDIANTE BIOPSIA LINFONODALE	92
5.7 MONITORAGGIO DELLA MALATTIA RESIDUA MINIMA MEDIANTE PCR EMI-NESTED.....	100
5.7.1 Selezione dei casi	100
5.7.2 Follow-up clinico e matrici.....	100
5.7.3 Validazione della PCR emi-nested visualizzata con elettroforesi capillare	101
5.7.2 Decorso Caso N°1	102
5.7.3 Decorso Caso N° 2	102
CAPITOLO 6:	104
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	104
6.1 DIAGNOSI MOLECOLARE DI LINFOMA	104
6.2 PROGnosi MOLECOLARE DI LINFOMA.....	110
BIBLIOGRAFIA	114

Introduzione

L'avvento delle tecniche di biologia molecolare in oncologia medica ha portato negli ultimi vent'anni notevoli contributi alla diagnosi delle patologie linfoproliferative entrando a far parte della più recente classificazione delle neoplasie linfoproliferative (WHO, 2001). La tipizzazione molecolare di alcune neoplasie linfoidi ha determinato infatti la definizione di nuovi tipi nosologici associati ad una prognosi ben precisa.

L'applicazione di markers quali la clonalità o le traslocazioni cromosomiche riveste una notevole importanza anche nel monitoraggio della Malattia Residua Minima; il termine "remissione o "recidiva molecolare" sono entrate a far parte del vocabolario medico oncologico e diversi marker molecolari sono tutt'ora al vaglio della sperimentazione.

In Medicina Veterinaria, lo studio genetico delle neoplasie e l'individuazione di markers tumorali sono in studio da pochi anni. Tutt'ora la classificazione delle patologie linfoproliferative basata sulla controparte umana, presenta difficoltà prognostiche notevoli considerando anche come i protocolli chemioterapici fino ad ora utilizzati nel cane siano stati utilizzati come un'unica entità patologica.

Negli ultimi 7 anni sono stati effettuati diversi interessanti studi molecolari sul linfoma canino utilizzando i riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici come marker diagnostico di clonalità, anche se non sono mai stati utilizzati come marcatori della malattia residua minima. Un tentativo preliminare di applicare un approccio molecolare finalizzato alla valutazione della MRM è stato impiegato recentemente dal nostro gruppo di ricerca. I risultati di questa tesi comprendono ed ampliano le strategie, i metodi ed i risultati di questo approccio.

CAPITOLO 1:

Genetica delle Immunoglobuline e del T-cell receptor

1.1 Introduzione

L'organizzazione genetica del sistema immunitario è nota da lungo tempo in Medicina Umana sebbene sia tuttora oggetto di numerosi studi volti ad approfondire alcuni aspetti della sua regolazione, ancora sconosciuti. Fin dai primi anni settanta, quando diversi studi evidenziarono l'omologia esistente nelle regioni variabili delle catene pesanti delle immunoglobuline tra l'uomo ed alcune specie animali, è stata postulata l'ipotesi di una conservazione nella struttura proteica e di conseguenza nella struttura genica del sistema immunitario (Kehloe e Capra, 1972; Machalonis e Schuler, 1988; Richards e Nelson, 2000). Anche se gli studi si concentrarono soprattutto sulle specie da laboratorio è stata ampiamente documentata la notevole similitudine e la conservazione dell'organizzazione genetica tra le varie specie di mammiferi (Tutter e Ribbler, 1989). A fronte di queste conoscenze, tuttavia, l'organizzazione e la regolazione dei loci genici che codificano per i recettori antigene-specifici, risulta poco conosciuta in Medicina Veterinaria, probabilmente perché recente è l'acquisizione del genoma canino completo. Per i motivi suddetti, nei paragrafi successivi si farà riferimento alla bibliografia umana, e dove possibile, allo stato dell'arte nella Medicina Veterinaria con particolare riferimento alla specie canina, oggetto di questo studio.

1.2 La risposta immunitaria

La risposta immunitaria dei vertebrati è caratterizzata da una reazione protettiva nei confronti di proteine, o parti di proteine, estranee all'organismo stesso (antigeni). L'efficacia di tale risposta è fortemente legata alla capacità del sistema immunitario di riconoscere le proprie proteine (*self*), da quelle estranee (*non-self*). Generalmente, gli antigeni penetrano nel torrente circolatorio determinando l'attivazione (fase di riconoscimento dell'antigene) e la successiva amplificazione della risposta immunitaria che esita nella distruzione della proteina *non-self* (Lewin, 2006).

Il sistema immunitario è in grado di determinare due tipi di risposta specifica all'antigene: la risposta umorale e cellulo-mediata.

La risposta umorale è caratterizzata dall'azione dei linfociti B e dai loro prodotti di secrezione, le immunoglobuline (Ig o anticorpi): la distruzione dell'antigene avviene grazie al legame che si forma tra lo stesso ed un'immunoglobulina specifica che riconosce la proteina estranea. Il legame antigene-anticorpo attiva, conseguentemente, le cellule effettrici del sistema immunitario che provvedono alla rimozione dell'immuno-complesso dal circolo.

La risposta cellulo-mediata è invece dominata dai linfociti T citotossici ed in questo caso, il riconoscimento dell'antigene avviene grazie alla sua *presentazione* nel contesto di una famiglia di proteine dette del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC). La risposta cellulo-mediata viene attivata soprattutto in presenza di parassiti endocellulari, per i quali è necessaria la processazione intracitoplasmatica e la successiva presentazione sulla superficie cellulare insieme al MHC (complesso MHC/antigene) da parte di cellule deputate a tale scopo (Antigen Presenting Cells, APC). Il successivo riconoscimento da parte delle cellule

T citotossiche ed in particolare del recettore del linfocita T (TCR, T-Cell Receptor), determina l'attivazione di meccanismi atti alla rimozione della cellula parassitata. Il prevalente od esclusivo tipo di risposta, dipende dal tipo di antigene, ed in ogni caso, i due compartimenti rappresentano un unico insieme integrato. L'attivazione della risposta immunitaria avviene quindi attraverso il riconoscimento della proteina *non self*, da parte dei linfociti T o B, seguito dalla successiva espansione clonale dei linfociti specifici per tale antigene (teoria della selezione ed espansione clonale) (Lewin, 2006).

Per quanto appena detto, il sistema immunitario di un individuo deve presentare una potenzialità praticamente illimitata di generare anticorpi differenti o recettori delle cellule T differenti, poiché ogni singola immunoglobulina od ogni singolo TCR è in grado di riconoscere un solo antigene (Lewin, 2006). Inoltre, essendo lo scopo della risposta immunitaria quello di attaccare un bersaglio estraneo, un aspetto cruciale della funzione dei linfociti T e B è quello di distinguere ciò che è parte dell'organismo da ciò che non lo è. La proprietà che impedisce ai linfociti di attaccare le cellule proprie dell'organismo viene chiamata tolleranza immunitaria, e viene generata probabilmente in uno stadio precoce dello sviluppo linfocitario, quando cellule B e T che riconoscono antigeni propri vengono distrutte per apoptosi (delezione clonale).

Per comprendere come il sistema immunitario sia in grado di produrre proteine, ognuna delle quali specificatamente progettata per riconoscere un antigene, la cui struttura non può essere anticipata, occorre conoscere la struttura e l'organizzazione genetica delle immunoglobuline e del TCR.

1.3 Struttura molecolare delle Ig e del TCR

1.3.1 Immunoglobuline (Ig)

Le immunoglobuline sono proteine tetrameriche costituite da due catene polipeptidiche pesanti (H) identiche e da due catene polipeptidiche leggere (L) identiche (Lewin 2006).

Interazioni non covalenti e ponti di-zolfo uniscono tra loro le due catene pesanti e ciascuna catena leggera alla catena pesante, generando la classica forma ad Y dell'immunoglobulina (Figura 1) (Modiano, 2000).

Le catene leggere e quelle pesanti hanno in comune lo stesso tipo generale di organizzazione, in cui ciascuna catena consiste di due regioni principali: la regione variabile (regione V) ammino-terminale e la regione costante (regione C) carbossi-terminale (Lewin, 2006). Regioni corrispondenti delle catene pesanti e leggere si associano per generare *domini*, ossia sequenze aminoacidiche molto simili che si ripetono più volte: due volte nelle catene leggere e 4 o 5 volte nelle catene pesanti. (Lewin, 2006; Morrison e Neuberger, 2001).

Il dominio localizzato all'estremità N-terminale delle catene pesanti e delle catene leggere è chiamato dominio variabile o dominio V poiché è costituito da una sequenza amminoacidica che differisce significativamente tra le singole immunoglobuline conferendo loro un'enorme versatilità; tale dominio è in effetti responsabile del riconoscimento dell'antigene (Lewin, 2006).

All'interno di ciascun dominio variabile (V_H e V_L) la massima variabilità non è distribuita uniformemente, ma è concentrata in tre regioni ipervariabili.

Si tratta di sei segmenti polipeptidici, tre appartenenti alla catena leggera, denominati L1, L2 e L3 e tre appartenenti alla catena pesante: H1, H2 ed H3 (Modiano, 2000).

Questi segmenti formano una superficie complementare rispetto alla struttura tridimensionale dell'antigene destinato a legarsi; per questo sono più comunemente chiamati regioni di complementarità o CDRs (Complementarity Determining Regions: CDR1, CDR2 e CDR3) (Modiano, 2000).

Tra le tre regioni ipervariabili CDR sono intercalate altre quattro regioni di minore variabilità amminoacidica denominate regioni strutturali o Framework Regions (FRI, FRII, FRIII e FRIV).

Nelle rimanenti regioni della catena leggera e della catena pesante, le sequenze amminoacidiche sono sostanzialmente identiche tra le immunoglobuline appartenenti alla stessa classe o isotipo; per questa ragione si parla di domini costanti (C).

Vi è un dominio costante della catena leggera (C_L) e 3 domini costanti della catena pesante (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}), numerati a partire dall'estremità amminica; le IgM e le IgE, che hanno catene pesanti più lunghe, presentano un ulteriore dominio C_{H4} .

Le catene leggere possono essere di due tipi: lambda (λ) o kappa (κ).

Ogni classe immunoglobulinica può presentare catene leggere di tipo κ oppure di tipo λ ma le singole immunoglobuline non presentano mai contemporaneamente una catena di un tipo ed una di un altro (Lewin, 2006).

In condizioni normali, nell'uomo, l'espressione delle catene leggere κ e λ nelle Ig è in rapporto di equilibrio (Rezuke et al, 1997), mentre nel cane l'espressione di λ predomina su κ (Arun et al; 1996).

I linfociti B presentano sulla superficie cellulare un recettore, chiamato B-Cell Receptor (BCR), con le stesse caratteristiche strutturali delle immunoglobuline che verranno prodotte dalla cellula dopo il riconoscimento dell'antigene da parte di questo recettore (Jung et al, 2006). (Figura 1)

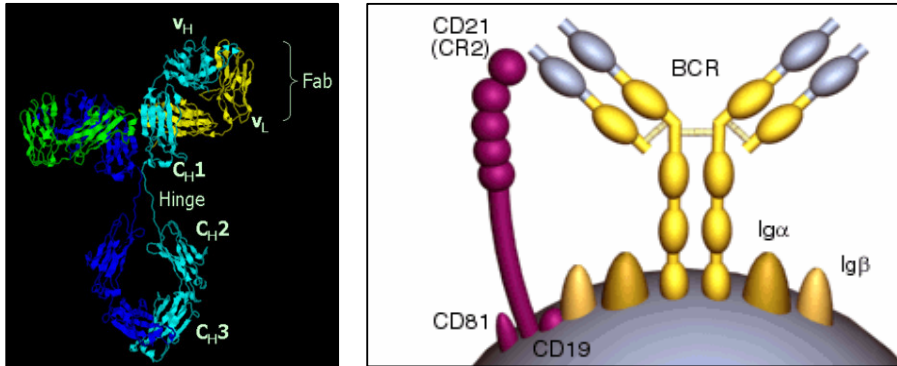


Figura 1

a) Struttura cristallografica di un'immunoglobulina con la classica forma a Y

Da *Wikipedia*, 2006.

b) Struttura tridimensionale del B-cell Receptor sulla superficie di un linfocita

Da *Wikipedia*, 2006.

1.3.2 TCR

Il TCR è un complesso proteico posto sulla superficie cellulare di tutti i linfociti T dove, insieme ad altre strutture proteiche e co-recettori costituisce il complesso recettoriale T (T-cell receptor complex). Il TCR è responsabile del riconoscimento dell'antigene ed ha una struttura molto simile a quella delle immunoglobuline: è costituito da due catene polipeptidiche legate da ponti di-solfuro, ciascuna caratterizzata da una porzione variabile, una porzione costante e da un sito di legame per l'antigene, dato dall'unione dei due domini a livello della regione variabile (Figura 2). Nella maggior parte dei linfociti T circolanti (95%) le due

catene polipeptidiche sono rappresentate dalle catene α e β , nei rimanenti 5% dalle catene γ e δ (Medeiros e Carr, 1999; Lewin, 2006).

Il TCR è costituito da 3 domini: un dominio extracellulare rappresentato dalle regioni costanti e variabili delle due catene; un dominio intracellulare formato dalle due code delle catene e un dominio trans-membrana dove sono presenti aminoacidi carichi positivamente. (Figura 2).

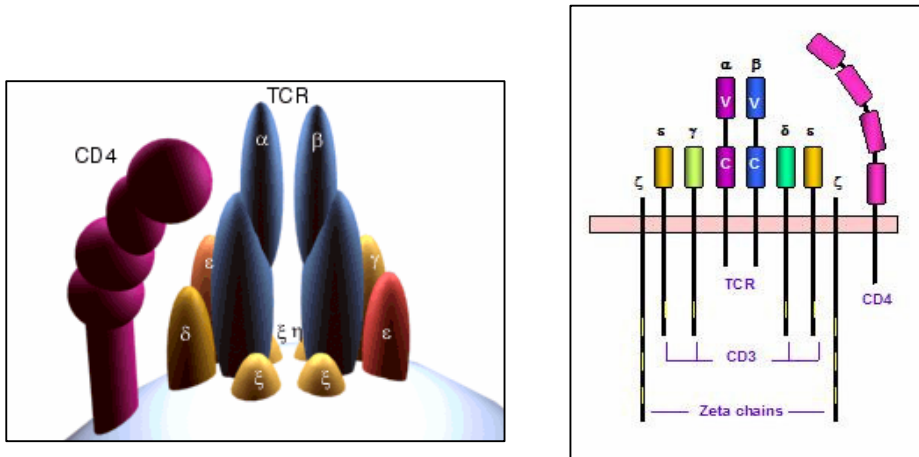


Figura 2

a) Struttura tridimensionale del TCR sulla superficie di un linfocita T helper

Da *Wikipedia*, 2006.

b) Domini del TCR (evidenza dei domini transmembranari ed intramembranari e struttura del CD3 e del CD4. Da *Wikipedia*, 2006.

Come le immunoglobuline, il TCR presenta a livello del sito di riconoscimento per l'antigene, tre regioni ipervariabili, anch'esse denominate regioni di complementarità e caratterizzate da una particolare disposizione che rispecchia la loro funzione: le regioni CDR1 e CDR2 (una per ciascuna catena del TCR) hanno una localizzazione più periferica, mentre le due regioni CDR3, dotate di una maggiore variabilità antigenica, sono localizzate al centro della *tasca* di legame.

Il complesso recettoriale T è inoltre costituito da un complesso proteico di membrana chiamato CD3 (*cd complesso di segnalazione*). Tale struttura proteica viene attivata dal legame tra antigene e TCR e rappresenta il modo

con cui il recettore segnala all'interno della cellula di aver riconosciuto l'antigene (Lewin, 2006). Il CD3 è costituito da quattro proteine di tre tipi diversi (γ , δ , ϵ) associate in eterodimeri ($\gamma\epsilon$ e $\delta\epsilon$) che interagiscono con il TCR a livello dei domini transmembranari tramite amminoacidi carichi negativamente. Il complesso CD3 è costituito anche da due catene chiamate η e ζ che si associano a formare l'omodimero $\zeta-\zeta$ (nell'80% dei casi) o l'eterodimero $\eta-\zeta$ (nel 20% dei casi), contenuto interamente a livello intracitoplasmatico ed avente un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale. La proteina ζ svolge infatti il ruolo di proteina effettrice del complesso CD3 (Morrison e Neuberger, 2001; Lewin, 2006) (Figura 2).

I co-recettori CD4 o CD8 completano il complesso recettoriale T. Tali strutture proteiche associate al TCR compaiono tardivamente durante lo sviluppo linfocitario ed identificano le due classi dei linfociti T: la molecola CD4 identifica le cellule T con funzione *helper*, il CD8, quelle con funzione *citotossica*. Il linfociti T *helper* coadiuvano sia la risposta immunitaria umorale che cellulo-mediata, riconoscendo l'antigene se presentato nel contesto di una molecola MHC di classe II. Il linfocita T *citotossico* o *killer*, richiede per il riconoscimento, la presentazione dell'antigene associato ad una proteina MHC di classe I.

Alcuni TCR $\gamma\delta$ non presentano i co-recettori CD4 o CD8 e sembrano poter legare l'antigene direttamente, senza presentazione da parte delle molecole MHC (Richards e Nelson, 2000).

1.4 Organizzazione dei geni delle Ig e del TCR

È un assioma dei genetisti che la costituzione genetica di un organismo creata dalla combinazione di spermatozoi e uova, sia ereditata da tutte le

cellule somatiche e non subisce dei cambiamenti di contenuto del DNA; in effetti, l'acquisizione dei diversi fenotipi delle cellule somatiche avviene attraverso un controllo differenziale dell'espressione genica (Lewin, 2004). La struttura genetica delle cellule del sistema immunitario rappresenta una situazione del tutto eccezionale, in cui il contenuto del genoma cambia, quando la ricombinazione crea geni attivi nei linfociti.

L'organizzazione genetica del sistema immunitario è costituita da una serie di famiglie di geni correlati, detta *superfamiglia di geni delle immunoglobuline* (di cui fanno parte sia il TCR che le immunoglobuline), la cui struttura è molto simile: si tratta di geni V e di geni C che codificano per i domini V e C del polipeptide finale. Tale schema genetico viene detto *schema della linea germinale*, ed è proprio di tutte le cellule somatiche e della linea germinale dei linfociti. Nel contesto di tali famiglie, *gene* significa una sequenza di DNA che codifica per una parte distinta del polipeptide finale (Lewin, 2004); quindi i geni V codificano per le regioni variabili ed i geni C per le regioni costanti, ma nessuno dei due tipi di geni è espresso come unità indipendente. In effetti sebbene lo schema della linea germinale sia posseduto da tutte le cellule, soltanto nei linfociti, l'espressione genica avviene quando i geni V sono uniti ai geni C per creare un'unità di espressione che codifica un polipeptide, catena pesante o leggera che sia. Tale processo di ricombinazione porta quindi ad un avvicinamento fisico tra due segmenti V e C, creando un unico gene attivo i cui esoni corrispondono esattamente ai domini funzionali della proteina. Per questo motivo, si parla di segmenti genici V e C piuttosto che di geni V e C. Esistono numerosi segmenti V che possono essere combinati con i segmenti C (inferiori di numero) per generare polipeptidi molto diversi tra loro.

1.4.1 Immunoglobuline

Nell'uomo, i geni per le immunoglobuline sono organizzati in tre loci separati: un locus genico codificante per tutti i tipi di catene pesanti (locus H) e due loci per le catene leggere (loci λ e κ), situati su tre cromosomi diversi (il locus H, sul cromosoma 14, il locus κ sul cromosoma 2 ed il locus λ , sul cromosoma 22) (Matsuda et al, 1998). Nel cane, il locus genico H è stato identificato sul cromosoma 8 (Tamura et al, 2006).

Nell'uomo e nel cane, il dominio variabile delle catene leggere (λ e κ) è codificato dal segmento genico V e da un ulteriore segmento genico chiamato J (da Joining) che connette il segmento V al segmento C. Per la catena pesante, la regione variabile viene codificata da tre segmenti genici: oltre ai segmenti genici V e J (denominati V_H e J_H per distinguerli da quelli della catena leggera V_L e J_L), è presente un terzo segmento chiamato D_H (da Diversity), interposto a V_H e J_H (Modiano, 2000; Lewin, 2004).

Ad una distanza 3'variabile rispetto ai segmenti genici V sono posti i geni delle regioni costanti (C); negli animali, il locus della catena leggera κ ha un singolo gene C, λ possiede da 3 a 6 geni C, mentre i geni per le catene pesanti dei diversi isotipi (IgM, IgD, IgG, o IgE) sono organizzati in una serie di *tandem* il cui ordine è diverso in ogni specie animale (Modiano, 2000).

I segmenti genici V delle tre famiglie delle immunoglobuline (λ , κ , e H,) hanno un'organizzazione simile: il primo esone (chiamato esone leader) codifica per la cosiddetta sequenza segnale (peptide leader) che è coinvolta nel trasferimento della catena polipeptidica tradotta a livello ribosomiale, nel lume del reticolo endoplasmatico. Il secondo esone del segmento V, separato dal primo da un breve introne, codifica per la maggior parte della regione variabile. La parte rimanente della regione variabile è codificata dal segmento D (solo nella famiglia H) e dal segmento J (in tutte e tre le

famiglie); infine, il segmento J è separato tramite sequenze introniche dal segmento C, terzo esone del gene attivo (Lewin, 2006) (Figura 3).

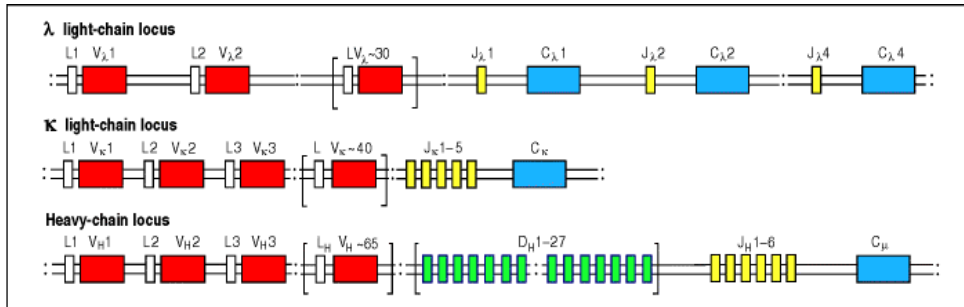


Figura 3 Organizzazione nel genoma umano dei loci della catena pesante e delle catene leggere di un'immunoglobulina. Da *Immunobiology*, Garland Publishing 2001.

1.4.2 TCR

L'organizzazione dei geni del TCR prevede 4 loci, ognuno dei quali codifica per una singola catena polipeptidica α , β , γ o δ ; i loci α e δ sono localizzati sul cromosoma 14, mentre i loci β e γ , sul cromosoma 7 (Wilson et al, 2001). Nel cane è stato recentemente identificato il locus genico TCR γ , localizzato sul cromosoma 18 (Yagihara et al, 2007).

Tali loci, mostrano una sorprendente somiglianza con quelli delle immunoglobuline. Il locus TCR α come il locus Ig κ , è costituito da segmenti V separati da un gruppo di segmenti J che precede un singolo segmento C (Lewin, 2004). L'organizzazione del locus TCR β assomiglia a quella del locus H: i segmenti V sono seguiti da due complessi DJC chiamati D1J1D1 e D2J2D2. Ogni complesso contiene un segmento D ed un segmento C, ma, il primo gruppo contiene 6 segmenti genici J (JB1 group) ed il secondo ne contiene 7 (JB2 group) (Rezuke et al, 1997).

Il locus TCR γ , come il locus Ig λ delle immunoglobuline ha un'organizzazione molto più semplice in cui i segmenti genici V sono separati da una serie di segmenti J-C.

Il locus genico del TCR δ rappresenta un caso particolare: i segmenti variabili δ sono infatti localizzati tra i segmenti genici V e J del TCR α .

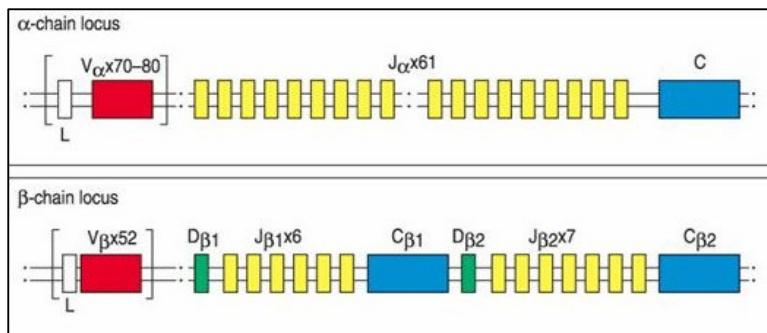


Figura 4 Organizzazione dei loci genici del TCR α e β nell'uomo.

Da *Immunobiology*, Garland Publishing 2001.

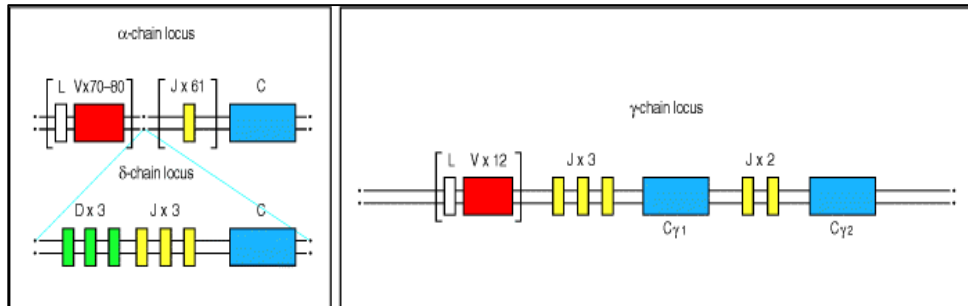


Figura 5 Organizzazione dei loci genici del TCR γ e δ nell'uomo

Da *Immunobiology*, Garland Publishing 2001

1.5 La diversità immunitaria

Lo studio delle caratteristiche strutturali e funzionali dei geni delle immunoglobuline e del TCR hanno permesso di formulare diverse ipotesi sull'acquisizione della diversità immunitaria. In particolare si ritiene che quattro meccanismi fondamentali siano in grado di spiegare l'enorme

potenzialità di riconoscimento antigenico del sistema immunitario: la ricombinazione somatica, la diversità combinatoria, la diversità giunzionale e l'ipermutazione somatica (Lewin, 2004).

1.5.1 Ricombinazione somatica (Riarrangiamento V(D)J)

La ricombinazione somatica è un processo di ricombinazione del DNA genomico che tipicamente avviene nei linfociti T e B. Come già precedentemente esposto, la possibilità di ricombinare il DNA e creare nuovi geni attivi è prerogativa del sistema immunitario nel quale, durante lo sviluppo dei linfociti, i segmenti genici riarrangiano in maniera sequenziale per formare gli esoni della regione variabile. Le modalità con cui avvengono i riarrangiamenti genici sono diversi all'interno dei diversi loci delle immunoglobuline e del TCR, pur presentando alcune somiglianze che rispecchiano quelle strutturali prima descritte.

Immunoglobuline

Il processo di ricombinazione somatica nelle catene leggere inizia con l'unione di un segmento genico V ad un segmento genico J generando la sequenza VJ-C. Durante questa ricombinazione si generano 3 esoni, separati da altrettanti introni: gli esoni L, V e l'esone C.

Tutto il tratto di DNA viene trascritto in un pre-RNA messaggero (o trascritto primario) in cui sono ancora presenti le sequenze introniche. La successiva processazione porta all'eliminazione mediante splicing degli introni situati tra L e VJ e tra il complesso VJ e il segmento C, dando origine ad un RNA messaggero che viene infine tradotto con produzione della catena polipeptidica.

Nel locus H, il processo di ricombinazione somatica che genera una completa regione variabile si realizza in due eventi separati.

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

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

Durante la processazione del trascritto primario di RNA, gli esoni della regione C e la sequenza leader si uniscono al complesso VDJ in seguito all'eliminazione degli introni mediante splicing.

Si forma quindi un mRNA che infine viene tradotto con produzione della catena polipeptidica di una catena pesante.

Dopo la traduzione si verifica la rimozione della sequenza leader e la formazione dei ponti disolfuro che uniscono le catene polipeptidiche. In posizione 3' rispetto all'RNA di ciascuna regione costante (C_H) vi sono dei siti di poliadenilazione (uno per le μ , uno per le σ e così per le altre classi): soltanto in uno di questi, in base all'isotipo che deve essere espresso, vengono aggiunti numerosi nucleotidi di adenina, chiamati "code di poli-A" che guidano lo splicing; così, ad esempio, se viene poliadenilato il sito in 3' rispetto alla C_{ϵ} viene espressa la IgE e il tratto di RNA tra il complesso VDJ e il C_{ϵ} viene eliminato grazie allo splicing. La traduzione dell'mRNA maturo porta alla produzione di una catena μ funzionante; questa impedisce il riarrangiamento del locus della catena pesante sull'altro cromosoma; tale fenomeno prende il nome di esclusione allelica (Jung et al, 2006).

Se, tuttavia, per qualsiasi motivo non si produce una catena pesante funzionante, si attua il riarrangiamento sull'altro allele; infine, se anche

questo porta ad una catena pesante abortiva, si ha la morte della cellula per apoptosi (Jung et al, 2006).

La ricombinazione del DNA nei loci κ e λ per la produzione delle catene leggere inizia soltanto dopo che è avvenuto il riarrangiamento e la successiva espressione dei geni della catena pesante.

Il locus κ è il primo ad andare incontro al processo di ricombinazione e la produzione di una catena leggera κ funzionale blocca il riarrangiamento a livello del locus λ , poiché ogni linfocita produce un solo tipo di catena leggera (fenomeno dell'esclusione allelica).

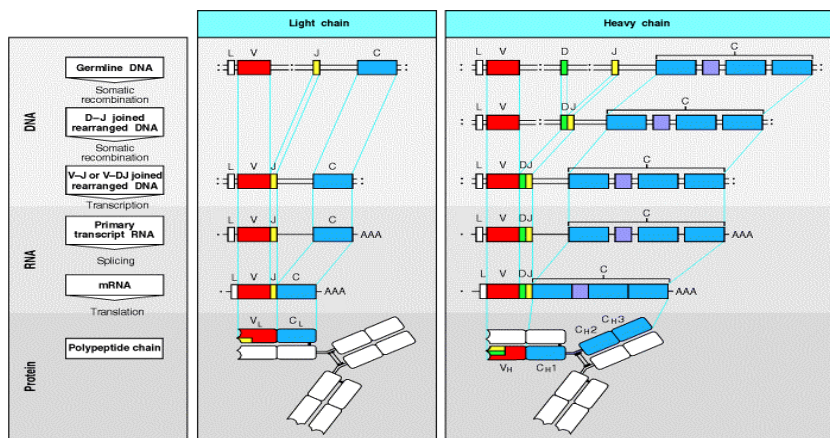


Figura 6 I geni delle regioni variabili e costanti delle immunoglobuline sono prodotti attraverso il processo di ricombinazione somatica dei segmenti genici Da *Immunobiology*, Garland Publishing 2001

TCR

Il riarrangiamento genico del TCR avviene nel timo e segue meccanismi simili a quelli precedentemente descritti per le immunoglobuline (Figura 7).

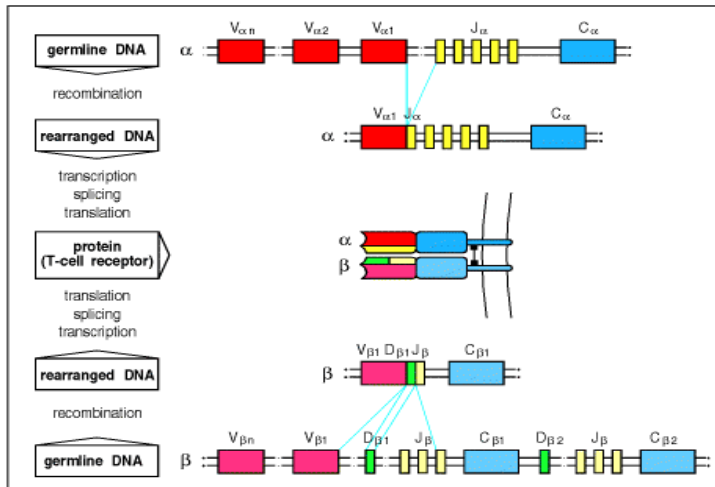


Figura 7 Ricombinazione somatica nei loci α e β del TCR

Da *Immunobiology*, Garland Publishing 2001

La ricombinazione dei geni del TCR α/β origina nel locus genico β . Inizialmente, si verifica un congiungimento tra i segmenti $D\beta$ e $J\beta$ che determina la formazione di un unico segmento genico $DJ\beta$ con eliminazione del DNA interposto (Figura 7). Successivamente si verifica il riarrangiamento tra $DJ\beta$ e uno dei segmenti $V\beta$ creando il segmento genico $VDJ\beta$ che codifica per la regione variabile della catena β . Infine $VDJ\beta$ si congiunge con il segmento $C\beta 1$ e, se tale riarrangiamento risulta produttivo, la catena β viene sintetizzata (Lewin, 2004).

Il riarrangiamento dei geni della catena α è simile a quello della catena β , con la differenza che in questo caso mancano i segmenti genici D. Una volta prodotta, la catena α viene espressa sulla membrana insieme alla catena β ed il linfocita T è pronto per la selezione timica. Ogni cellula T può ricombinare in modo produttivo una sola catena β a causa del fenomeno di esclusione allelica, presente anche nel TCR; tale esclusione

non avviene per le catene α che possono subire riarrangiamenti multipli (Jung et al, 2006).

Come già detto in precedenza, il locus δ si trova intercalato tra i segmenti genici V e J della catena α e a causa della sua localizzazione, ogni riarrangiamento dei segmenti genici del TCR α induce una delezione dei geni δ , che vengono rimossi in due tappe durante il processo di ricombinazione di V α con J α . Questo processo di esclusione porta inevitabilmente all'impossibilità di co-espressione α - δ ; l'attivazione del locus δ determina la ricombinazione VDJ, anche se è possibile l'incorporazione di entrambi i segmenti D e la creazione di un riarrangiamento VDDJ (Lewin, 2004).

1.5.2 Diversità combinatoria

Nello *schema genetico della linea germinale* di ciascun individuo, sono presenti molteplici copie dei segmenti genici V, D e J che codificano per la regione variabile delle immunoglobuline e del TCR: la selezione e la successiva combinazione *random* di questi segmenti contribuisce significativamente alla grande diversità delle regioni variabili delle immunoglobuline.

Il numero massimo di combinazioni possibili per ogni locus genico è dato dal prodotto del numero dei segmenti genici V, J e D (per il locus H e i loci TCR β e δ) o V e J (per i loci delle catene leggere e il TCR α e γ). Tuttavia, il grado di diversità combinatoria che si può generare può essere molto minore rispetto a quello atteso, perché non tutti i segmenti genici sono scelti con uguale frequenza e non tutte le possibili combinazioni danno origine a polipeptidi funzionali. Esistono segmenti genici non funzionali chiamati *pseudogeni* e numerosi riarrangiamenti che incorporano uno

pseudogene possono risultare non produttivi. Ad esempio nell'uomo, sono stati identificati per il locus H, 123 segmenti V, dei quali soltanto 39, risultano funzionali ed in grado di determinare riarrangiamenti produttivi (Matsuda et al, 1998).

Tuttavia, il locus H possiede oltre ai segmenti V, 27 segmenti D e 4 segmenti J, che ricombinandosi possono dare origine a circa 4000 combinazioni.

Le possibilità di ricombinazione delle catene leggere sono notevolmente inferiori rispetto al locus H: la catena k possiede 40 segmenti genici V e 5 segmenti genici J (40 X 5), per un totale di circa 200 ricombinazioni, per la catena λ sono invece possibili circa 120 combinazioni (30 x 4) (Lewin, 2004).

Sebbene la funzione delle immunoglobuline sia determinata dall'azione complementare delle catene pesanti e delle catene leggere, per quanto prima esposto, il maggior contributo alla generazione della diversità e della specificità delle immunoglobuline, viene dato proprio dal locus H (Matsuda et al, 1998).

Inoltre ogni possibile catena pesante prodotta si può legare ad ogni possibile catena leggera; questo permette di aumentare ulteriormente la diversità combinatoria della regione variabile delle Ig: $320 (200 + 120) \times 4000 = 128000$ combinazioni.

Recentemente è stato proposto uno schema di organizzazione del TCR γ nel cane: secondo Yagihara e collaboratori (2007), il locus TCR γ , posto sul cromosoma 18, sarebbe composto da 4 segmenti V, preceduti da quattro sequenze L, 6 segmenti J e 4 segmenti C.

1.5.3 Diversità giunzionale

La ricombinazione dei geni delle Ig e del TCR, è caratterizzata da un riarrangiamento fisico di sequenze che comporta rotture ed unioni che devono avvenire secondo precisi schemi garantiti da meccanismi strettamente regolati (Lewin, 2004).

Il riarrangiamento VDJ è guidato dall'attività coordinata delle *ricombinasi*, un complesso enzimatico che contiene i prodotti proteici dei geni RAG-1 e RAG-2 (Recombination Activating Genes), in grado di riconoscere quale segmento ricombinare grazie a sequenze conservate non codificanti di DNA dette sequenze consenso o *recombination signal sequences* (RSS) (Lewin, 2004).

Ogni RSS è costituita da una sequenza altamente conservata di sette nucleotidi chiamata eptamero (localizzata sempre accanto alla sequenza codificante), seguita da una sequenza non conservata di 12 o 23 nucleotidi denominata *spacer*, a sua volta seguita da un'altra sequenza conservata di nove nucleotidi, detta nonamero (Jung et al, 2006) (Figura 8).

Nel locus κ , i segmenti V sono seguiti dalla sequenza eptamerica e nonamerica separate fra loro da uno *spacer* di 23 paia di basi; nei segmenti J, lo *spacer* tra le due sequenze conservate è costituito da 12 nucleotidi (Figura 8).

Nel locus λ , la situazione è simile, ma la spaziatura tra eptamero e nonamero è invertita: 12 nucleotidi per i segmenti V e 23 per i segmenti J. Nel caso del locus H, la situazione è più complessa: nei segmenti V l'eptamero e il nonamero sono spazati da 23 paia di basi, nei segmenti J le due sequenze conservate sono spaziate da 23 paia di basi, mentre i segmenti D presentano le due sequenze conservate separate da 12 paia di basi sia in direzione 5' che in 3'. Nella ricombinazione è generalmente

seguita la “regola del 12/23”, che prevede il riarrangiamento di due segmenti genici solo se uno ha uno spacer di 12 nucleotidi e l’altro di 23. Questo spiega la sequenza nella ricombinazione delle catene pesanti: ciascun segmento V_H e J_H possiede uno spacer di 23 nucleotidi e non può quindi essere ricombinato; prima è necessaria la ricombinazione tra il segmento V e il segmento D o tra il segmento D e il segmento J. Le ricombinazioni fra i segmenti V e J sono invece consentite nei loci κ e λ , dove i segmenti conservati presentano sequenze spaziatrici di 12 e 23 paia di basi.

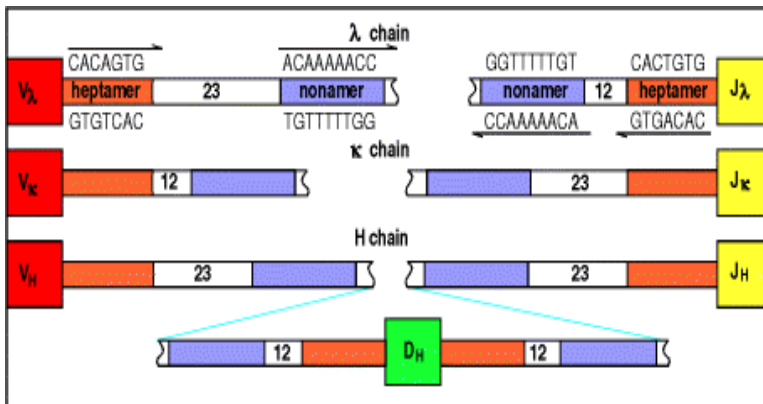


Figura 8. Disposizione delle sequenze conservate (eptamero e nonamero) e degli spacer tra i segmenti genici che codificano le regioni variabili delle catene pesanti (H) e delle catene leggere κ e λ . Da *Immunobiology*, Garland Publishing, 2001

Le sequenze spaziatrici hanno quindi lo scopo di impedire ricombinazioni non corrette, ad esempio, tra segmenti genici dello stesso tipo o nel caso del locus H, l’eventuale riarrangiamento diretto tra i segmenti V e J.

Il processo di ricombinazione avviene quando la ricombinasi RAG1, riconosce ed allinea le sequenze consenso (RSS) appropriate, reclutando RAG2 nel complesso: il nonamero fornisce il sito di riconoscimento iniziale mentre l’eptamero dirige il sito di taglio (Lewin, 2004). Il complesso enzimatico così formato, incide il filamento di DNA in

direzione 5' rispetto alla sequenza eptamerica (l'estremità contigua alla sequenza codificante), producendo una rottura a singolo filamento (*nick*). Tale incisione determina l'esposizione di un gruppo OH- terminale in direzione 3' e P-terminale in direzione 5': il gruppo OH, attacca il gruppo fosfato nell'altro filamento, creando una forcina al terminale della sequenza codificante, in cui l'estremità 3' di un filamento è unita all'estremità 5' dell'altro filamento di DNA, determinando perciò una rottura a doppia elica (*Double strand break*, DSB). Il DSB, determina il rilascio di un intero frammento di DNA, contenente gli eptameri, posto tra le due sequenze codificanti: le estremità di tale frammento vengono denominate estremità segnale, mentre quelle prodotte sulle sequenze codificanti (V, J, o D), vengono chiamate estremità codificanti. Le forcine alle estremità codificanti, forniscono il substrato dello stadio successivo della reazione: un'incisione a singolo filamento, accanto alla forcina, che determina un disaccoppiamento delle estremità codificanti con sporgenza di un singolo filamento. Tale sporgenza, viene eliminata con sintesi di nucleotidi complementari (nucleotidi palindromici, P), che ricostituiscono il doppio filamento (duplex). Durante questo processo di rifinitura delle estremità codificanti, vengono anche aggiunte alcune basi extra, apparentemente con sequenze casuali (nucleotidi N), ad opera dell'enzima TdT (deossinucleotidil transferasi terminale) (Figura 9a). Gli N-nucleotidi vengono aggiunti in special modo nelle giunzioni V-D e D-J del locus della catena pesante e sono meno comuni nei geni della catena leggera, poiché la TdT viene espressa solo per un breve periodo nello sviluppo B-cellulare durante il riarrangiamento genico della catena pesante, che si verifica prima di quello della catena leggera. L'ultima fase della reazione è l'unione delle estremità codificanti rifinite, che frequentemente, determina anche l'unione

delle estremità segnale del frammento generato dalla rottura della doppia elica, formando una molecola circolare (Figura 9b).

Per quanto precedentemente esposto, i meccanismi enzimatici coinvolti nella rottura e nella successiva riunione del DNA assicurano che una giunzione codificante possa avere una sequenza diversa da quella che sarebbe prevista con un'unione diretta delle estremità V,D e J. I cambiamenti di sequenza a livello giunzionale rendono possibile un'estesa diversità di questo sito (cd diversità giunzionale), che codifica per la regione CDR3, coinvolta nel riconoscimento antigenico: il massimo della diversità è quindi generato nel sito che entra in contatto con l'antigene bersaglio (Lewin, 2004).

Naturalmente, i cambiamenti nel numero di coppie di basi che avvengono nelle giunzioni codificanti, influenzano il modulo di lettura della sequenza poiché il processo di unione sembra essere del tutto casuale: soltanto un terzo delle sequenze unite mantiene il modulo di lettura corretto. Nei restanti casi, la presenza di un segmento fuori fase, sposta il modulo di lettura (frame-shift) determinando una conclusione prematura della traduzione (ricombinazione non produttiva) (Lewin, 2006, Morrison e Neuberger, 2001).

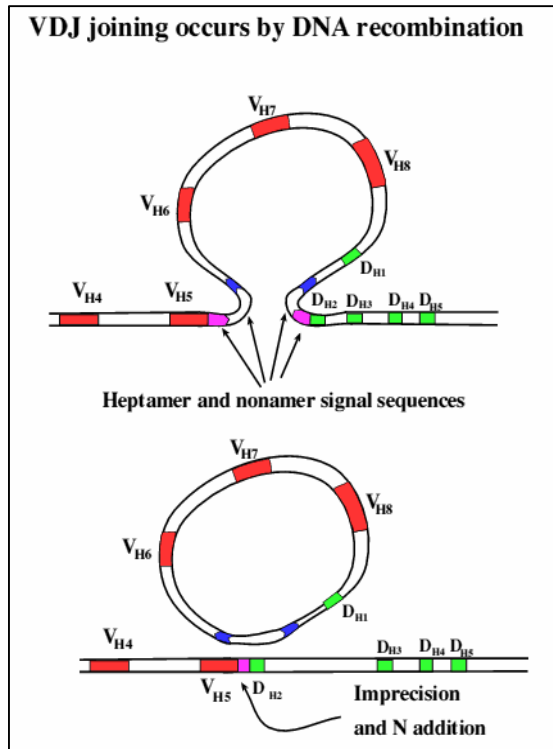
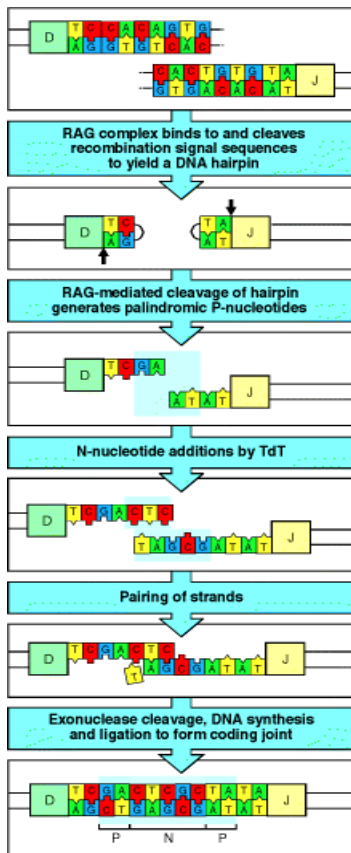


Figura 9

- a) Diversità giunzionale. Da *Immunobiology*, Garland Publishing, 2001.
- b) Azione delle ricombinasi sulle estremità codificanti e segnale. Da Holmes et al, Cambridge University, 2004.

1.5.4 Diversità somatica (Maturazione dell'affinità)

Negli organi linfoidi periferici i linfociti B maturi (centrociti o cellule del centro germinale) subiscono un'ulteriore diversificazione nel sito di riconoscimento antigenico tramite il processo di ipermutazione somatica.

Dopo l'incontro con l'antigene e la stimolazione del linfocita B da parte di un linfocita T helper, si generano delle mutazioni puntiformi nelle regioni geniche codificanti per i domini variabili, che determinano un aumento della variabilità in tutte e 3 le CDR di entrambe le catene immunoglobuliniche.

Poiché queste mutazioni avvengono in maniera casuale, solo alcune di esse sono in grado di aumentare l'affinità del recettore per l'antigene: la maggior parte delle mutazioni inducono una diminuzione o addirittura possono prevenire completamente l'espressione delle Ig attraverso la creazione di "codoni stop" (Harris et al, 2001).

Pertanto, soltanto i linfociti del centro germinale che subiscono mutazioni in grado di aumentare l'affinità del loro recettore per l'antigene vengono selezionati positivamente. Tutti gli altri (più del 90%) vanno incontro a morte cellulare per apoptosi (Harris et al, 2001).

Questo fenomeno è noto come maturazione dell'affinità e avviene soltanto nel corso delle risposte anticorpali ad antigeni proteici, dipendenti dalla cooperazione dei linfociti T-helper (Wilson et al, 2001).

A differenza di quanto accade per i linfociti B, la diversità recettoriale T non è aumentata da meccanismi di ipermutazione somatica. Diverse ipotesi sono state considerate per spiegare tale differenza: la prima ipotesi, è che l'assenza di tale processo sarebbe necessaria per evitare un'eccessiva variabilità del recettore con possibile comparsa di cloni linfocitari mutanti diretti contro strutture "self". Questa restrizione non si applica alle cellule B poiché affinché si realizzi il processo di ipermutazione somatica è necessaria la stimolazione del linfocita B da parte di un linfocita T helper. Anche se si creassero cloni linfocitari B mutanti verso bersagli "self", questi non sarebbero comunque in grado di produrre autoanticorpi, se non in seguito alla stimolazione da parte di un linfocita T helper allo stesso modo attivato da autoantigeni (Lewin, 2004).

Un'altra ipotesi è che un eventuale processo di ipermutazione somatica possa determinare una perdita della capacità di riconoscimento del complesso MHC da parte dei linfociti T e di conseguenza, la perdita di ogni

capacità di indurre una risposta immunitaria (Wilson et al, 2001, Lewin, 2004).

CAPITOLO 2:

Diagnosi e monitoraggio molecolare delle neoplasie linfoproliferative

2.1 Introduzione

Nel seguente capitolo verranno descritte le principali tecniche molecolari ad oggi utilizzate in medicina umana nella diagnosi e nella prognosi delle neoplasie linfoproliferative, con particolare riferimento alla PCR (Polymerase Chain Reaction), tecnica utilizzata nella fase sperimentale di questo lavoro. Attraverso le applicazioni della biologia molecolare nelle neoplasie linfoidi, verranno descritti i concetti di clonalità, traslocazione cromosomica e malattia residua minima (MRM).

2.2 Utilizzo delle tecniche molecolari nella diagnosi delle neoplasie linfoproliferative

In Medicina Umana, la diagnosi delle neoplasie linfoproliferative, prevede un approccio multiparametrico, in cui accanto alle tradizionali valutazioni cliniche e citomorfologiche, vengono applicate speciali tecniche di cito/istochimica, studi immunopatologici e metodiche di genetica molecolare, al fine di ottenere precise indicazioni patogenetiche e prognostiche (Rezuke et al,1997; Harris, 2001; Kocjan, 2005).

Le neoplasie linfoidi, pongono, talvolta, il clinico ed il patologo di fronte ad un dilemma diagnostico, soprattutto nello stadio iniziale della patologia, quando la distinzione tra una neoplasia incipiente ed uno stato di iperplasia reattiva può risultare estremamente problematica (Vernau, 2004). Inoltre, l'utilizzo preferenziale di tecniche poco invasive nella fase iniziale dei protocolli diagnostici clinici, (aspirazione con ago sottile o biopsie

guidate), determina spesso la presenza di materiale diagnostico scarso per quantità e/o qualità, creando un'ulteriore difficoltà di interpretazione (Kocjan, 2005). Un'altra considerazione, riguarda la possibilità che la citomorfologia, sebbene in grado di diagnosticare e classificare buona parte dei linfomi, risulti in alcuni casi del tutto insufficiente: è quanto avviene ad esempio in corso di proliferazioni linfocitarie mature, nelle quali la distinzione tra una linfocitosi ed una neoplasia linfoide indolente spesso non è possibile (Ben-Ezra et al, 2000; Vernau, 2004). Gli errori diagnostici comunemente associati alla citologia convenzionale comprendono anche la difficoltà di differenziare le diverse varianti di linfoma ed i linfomi dalle neoplasie metastatizzanti tipo "round cells" come neuroblastomi periferici e carcinomi a piccole cellule (Kocjan, 2005). Benché l'avvento delle tecniche immunopatologiche abbia in gran parte risolto tali problemi, l'applicazione di queste metodiche a piccole quantità di tessuto, non è sempre possibile. Inoltre, la diversità antigenica di questo eterogeneo gruppo di neoplasie, non permette in alcuni casi la diagnosi certa (Rezuke et al, 1997). Il miglioramento apportato dall'immunocito/istochimica al protocollo diagnostico delle neoplasie linfoproliferative è tuttavia indubbio, considerando la possibilità di identificare tramite queste tecniche la linea di origine della neoplasia che, come noto, presenta una notevole valenza prognostica (Rezuke et al, 1997). In tutti quei casi in cui la morfologia e le tecniche immunopatologiche non risultano esaustive dal punto di vista diagnostico, è necessario l'utilizzo di tecniche molecolari quali ad esempio la Southern Blotting (SB) o la PCR, che sono in grado di identificare una neoplasia linfoide in modo più oggettivo ed accurato (Vernau e Moore, 1999, Medeiros e Carr, 1999).

L'utilizzo delle tecniche di biologia molecolare, non è semplicemente limitato alla diagnosi delle neoplasie linfoidi, ma contribuisce in modo

significativo alla comprensione dei meccanismi patogenetici alla base di queste neoplasie, permettendo al contempo di rifinirne i criteri classificativi (l'identificazione di particolari mutazioni genetiche associate a diversi tipi di linfoma, ha contribuito alla nuova classificazione WHO delle neoplasie linfoproliferative) (Harris et al, 2000).

In conclusione, l'utilizzo delle tecniche molecolari nel protocollo di lavoro delle neoplasie linfoidi, è diventato un mezzo indispensabile nella diagnosi e nella stadiazione delle neoplasie linfoproliferative: gli obiettivi più importanti della diagnosi molecolare di linfoma sono la ricerca della clonalità e l'identificazione delle traslocazioni cromosomiche (Kocjan, 2005).

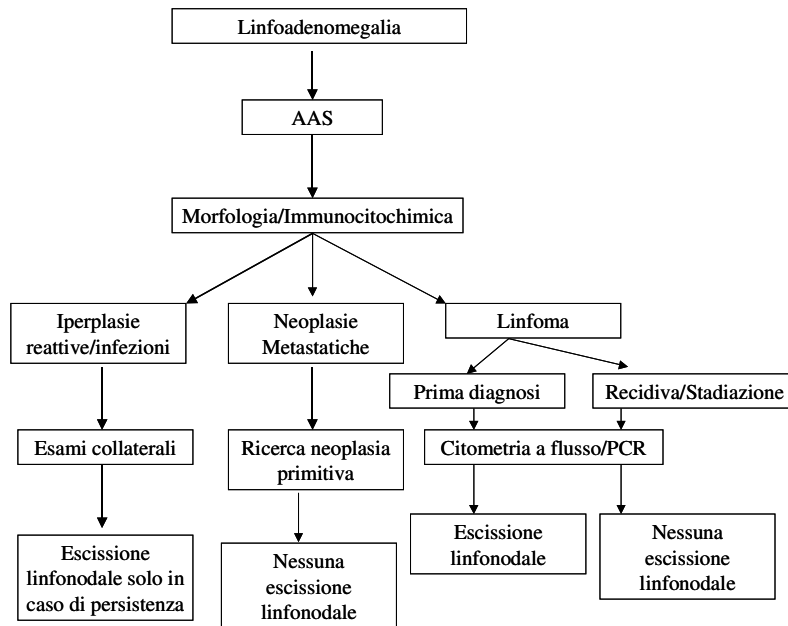


Figura 10. Algoritmo diagnostico del linfoma. Da Kocjan, 2005, modificato.

2.2.1 Ricerca della clonalità

Una neoplasia è costituita da una popolazione cellulare con identiche caratteristiche, derivata dalla proliferazione di un unico precursore comune e per questo definita clonale; pertanto, tutte le cellule tumorali contengono un'identica sequenza di DNA, che può essere utilizzata come marker specifico di neoplasia (Rezuke et al, 1997; Lana et al, 2006).

La clonalità nelle neoplasie linfoidi viene definita con diversi criteri: può essere suggerita dall'osservazione di una popolazione cellulare monomorfa o identificata con metodiche immunopatologiche per la presenza di un determinante antigenico monoclonale; essa è tuttavia determinata in modo più preciso ed accurato individuando la presenza di un riarrangiamento genico clonale dei recettori antigene-specifici o l'esistenza di alterazioni cromosomiche ricorrenti, tramite metodiche di biologia molecolare (Rezuke et al, 1997).

Le tecniche molecolari sono in grado di diagnosticare una neoplasia linfoide attraverso la dimostrazione della clonalità; tuttavia, essa deve essere sempre e comunque interpretata nel complesso dei riscontri clinici, morfologici ed immunofenotipici (Vernau e Moore, 1999). La contestualizzazione della clonalità è necessaria poiché, seppur fortemente indicativa di neoplasia, non è in grado singolarmente di dimostrare l'ipotesi neoplastica, né implica necessariamente la malignità: in altre parole, se la neoplasia è sempre clonale, l'inverso non è sempre vero (Vernau e Moore, 1999; Burnett et al, 2003). Esistono patologie infiammatorie o infezioni virali acute, accertate sia nell'uomo che nel cane, che possono indurre gammopatie monoclonali o alcune malattie linfoproliferative benigne dell'uomo che possono risultare clonali (ad esempio la linfadenopatia angioimmunoblastica, disordini linfoproliferativi AIDS-correlati, la linfocitosi a grandi granuli) (Burnett et al, 2003).

La ricerca della clonalità con metodiche di genetica molecolare trova la sua primaria applicazione in tutti quei casi in cui essa non può essere identificata con le tecniche tradizionali; la sensibilità di tali metodiche permette inoltre di riconoscere la presenza di una popolazione clonale anche quando questa rappresenta soltanto l'1% della totalità delle cellule (Rezuke et al, 1997), consentendo la possibilità di monitoraggio molecolare della neoplasia durante il trattamento antitumorale (Burnett et al, 2003).

2.2.2. Traslocazioni cromosomiche

I linfomi, analogamente alla maggior parte delle neoplasie, sono caratterizzati da lesioni genetiche in grado di determinare l'attivazione di proto-oncogeni o l'inattivazione di geni oncosoppressori. I proto-oncogeni sono geni normalmente coinvolti nella regolazione dei processi di crescita e proliferazione cellulare, con la potenzialità di contribuire alla

trasformazione neoplastica, quando strutturalmente o funzionalmente alterati. (Rezuke et al, 1997). L'avvento delle tecniche di genetica molecolare ha permesso di identificare nelle neoplasie linfoidi, molteplici lesioni genetiche, integralmente coinvolte nella loro patogenesi. La maggior parte delle anomalie genetiche identificate, sono ascrivibili a traslocazioni cromosomiche che determinano la trasposizione di un proto-oncogene da un cromosoma all'altro, inducendone l'attivazione (Rezuke et al, 1997; Harris et al, 2001). Una traslocazione cromosomica, è in grado di attivare un proto-oncogene anche attraverso la formazione di un trascritto di fusione, derivante dalla combinazione di due geni, localizzati nei due punti di rottura dei cromosomi coinvolti nella trasposizione (Rezuke et al, 1997; Medeiros e Carr, 1999; Harris et al, 2001). Le traslocazioni cromosomiche determinano delle deregolazioni trascrizionali di proto-oncogeni, attraverso due meccanismi: la deregolazione omotopica, che si verifica quando vi è un'alterazione della regolazione di un proto-oncogene che viene fisiologicamente espresso dalla cellula e la deregolazione eterotopica, che si riferisce all'attivazione di un proto-oncogene che normalmente non viene espresso dalla cellula (Harris et al, 2001).

Dal punto di vista diagnostico, la scoperta di traslocazioni cromosomiche specifiche in determinati tipi di linfoma, ha permesso di complementare e raffinare i criteri classificativi dell'istologia tradizionale, portando all'identificazione di specifici tipi nosologici in base alla presenza o l'assenza di una determinata lesione genetica. Tale considerazione è soprattutto valida per i linfomi non-Hodgkin ed in particolar modo per i *B-diffusi a grandi cellule* (DLBCL) un gruppo di neoplasie, eterogeneo dal punto di vista clinico e prognostico in cui i criteri morfologici non sono sufficienti a stabilire l'esatta entità patologica (De Paepe e Wolf-Peeters, 2007).

Quattro esempi di proto-oncogeni identificati nelle neoplasie linfoidi e coinvolti nella loro patogenesi sono il *bcl-2* (linfoma follicolare), il *bcl-1* (linfoma mantellare) il *c-MYC* (linfoma di Burkitt) ed il *PAX-5* (linfoma linfoplasmacitico) (Rezuke et al, 1997; Harris et al, 2001; Kocjan, 2005; Bende et al, 2007).

A differenza della maggior parte dei proto-oncogeni, il *bcl-2* non regola direttamente la proliferazione cellulare, bensì è preposto al controllo della morte cellulare programmata o apoptosi (Harris et al, 2001). Nell'ambito dei linfomi follicolari, la sua attivazione avviene tramite la traslocazione t(14;18) (q32;q21), che determina la giustapposizione del gene *bcl-2*, (cromosoma 18), al locus H (cromosoma 14) cui consegue la deregolazione trascrizionale omotopica di tale gene: l'iperespressione di *bcl-2* così ottenuta protegge la cellula neoplastica dall'apoptosi. La traslocazione t(14;18) è stata segnalata in oltre l'80% dei casi di linfoma follicolare umano (Rezuke et al, 1997; Harris et al, 2001).

La traslocazione t(11;14)(q13;q32) associata al linfoma mantellare determina la giustapposizione del proto-oncogene *bcl-1* (anche conosciuto come CCND-1), posto sul cromosoma 11, al segmento genico J del locus H nel cromosoma 14. Tale trasposizione determina la deregolazione eterotopica del gene *bcl-1* che codifica per la Ciclina D1, coinvolta nella progressione dalla fase G1 alla fase S, promovendo di conseguenza la proliferazione cellulare (Harris et al 2001).

Le traslocazioni che coinvolgono l'oncogene *c-MYC*, sono presenti nel 100% dei linfomi di Burkitt AIDS-correlati (Harris et al, 2001). Il 75% delle traslocazioni cromosomiche che si manifestano in questa patologia sono di tipo t(8;14)(q24;q32), e determinano lo spostamento del locus *c-MYC* (cromosoma 8), verso la porzione distale del locus H, sul cromosoma 14 (Busch et al, 2004). La conseguenza più comune di tale trasposizione è

la deregolazione omotopica del gene *c-MYC* che codifica per una fosfoproteina nucleare, deposta al controllo della crescita e della proliferazione cellulare (Harris et al, 2001). I siti di rottura cromosomica di *c-MYC* e dei geni del locus H, sono specifici per ogni paziente; di conseguenza la traslocazione *c-MYC/H*, rappresenta un marker molecolare paziente-specifico (Busch et al, 2004).

Un'ulteriore esempio di marker molecolare di linfoma è la traslocazione t(9;14)(q13;q32), riscontrata nel 50% dei linfomi linfoplasmacitici ed in particolar modo associata allo sviluppo della Macroglobulinemia di Waldenström. Tale traslocazione coinvolge oltre al locus H, il gene *PAX-5* che codifica per un fattore trascrizionale specifico per il controllo della proliferazione B-cellulare. La trasposizione determinerebbe la deregolazione omotopica di tale gene contribuendo alla linfomagenesi (Harris et al, 2001).

Le traslocazioni cromosomiche in corso di linfoma, sono diventate importanti marcatori genetici di neoplasia che non hanno soltanto importanti implicazioni diagnostiche, ma possono essere utilizzati a fini prognostici, nel monitoraggio della risposta terapeutica (Harris et al, 2000, Bende et al, 2007).

Tra le tecniche molecolari utilizzate per l'identificazione di specifiche traslocazioni cromosomiche, la PCR risulta quella maggiormente impiegata come metodica diagnostica pratica e per il monitoraggio della malattia dopo trattamento terapeutico (Rezuke et al, 1997).

Tabella 1. Traslocazioni cromosomiche in corso di linfoma. Da Harris et al, 2001,

Linfoma	Traslocazione	% dei casi	Proto-oncogene coinvolto	Meccanismo di attivazione	Funzione
Linfoplasmacitico	t (9;14)	50	<i>PAX-5</i>	Deregolazione Trascrizionale	Controllo proliferazione B
Follicolare	t (14;18)	90	<i>Bcl-2</i>	Deregolazione Trascrizionale	Regolatore negativo apoptosi
Mantellare	t (11;14)	70	<i>Bcl1</i>	Deregolazione Trascrizionale	Controllo Ciclo cellulare
MALT	t (11;18)	50	<i>APII/MLT</i>	Proteina di Fusione	Regolatore negativo apoptosi
Burkitt	t (8;14)	80	<i>c-MYC</i>	Deregolazione Trascrizionale	Controllo ciclo cellulare
T Anaplastico	t (2;5)	60	<i>NPM/ALK</i>	Proteina di Fusione	Tirosin Kinasi

modificato.

2.2.3 Malattia Residua Minima (MRM)

Benché i moderni protocolli terapeutici siano in grado di indurre la completa remissione dei sintomi in un'alta percentuale di pazienti affetti da neoplasie linfoproliferative, la maggior parte di essi, infine, ricidiva (Bruggemann et al, 2004).

La fonte di questa ricaduta deriva dalla presenza di una popolazione cellulare neoplastica che persiste a livelli non evidenziabili dalle metodiche convenzionali. (Rezuke et al, 1997).

All'ammissione clinica, un paziente affetto da una neoplasia linfoproliferativa può presentare circa 10^{12} cellule tumorali, che vengono facilmente rilevate all'esame microscopico. Dopo la fase di induzione chemioterapica, il paziente può raggiungere la remissione clinica completa, anche se in realtà una popolazione neoplastica di 10^8 - 10^9 cellule tumorali può permanere. Le tradizionali tecniche morfologiche non sono in grado di differenziare una popolazione costituita da 10^9 cellule neoplastiche, da una popolazione non neoplastica (Rezuke et al, 1997); questo significa che la remissione clinica risulta compatibile con la persistenza di una quantità considerevole di cellule neoplastiche residue (Bruggeman et al, 2004).

Questa "riserva" di cellule neoplastiche, evidenziabili soltanto attraverso metodiche molecolari è comunemente chiamata Malattia Residua Minima o MRM (Braziel et al, 2003).

La malattia residua minima ha un importante significato prognostico: in primo luogo, permette un monitoraggio molecolare del comportamento della neoplasia durante la chemioterapia, consentendo di apprezzare la sensibilità delle cellule neoplastiche al trattamento (efficacia terapeutica); in secondo luogo, essa consente di individuare i pazienti ad alto rischio di recidiva (Dolken 2001; Van der Velden et al, 2004). Tali implicazioni prognostiche, hanno determinato la possibilità di intervenire sul piano terapeutico al fine di ottenere la scomparsa del clone neoplastico residuo raggiungendo la *remissione molecolare completa* e al contempo ridurre l'intensità terapeutica nei pazienti con MRM non rilevabile. Tuttavia, gli studi eseguiti sulla MRM hanno dimostrato che pazienti con diverse forme di linfomi non-Hodgkin possono avere remissioni cliniche durature, nonostante la persistenza di un clone neoplastico residuo e che pazienti con diverse forme di leucemia possono mostrare una remissione clinica e molecolare duratura, senza tuttavia raggiungere la guarigione completa

(Bruggeman et al; 2004). Tali considerazioni hanno determinato un acceso dibattito tra i ricercatori, soprattutto legato alla necessità di standardizzare i tempi ed i modi di rilevamento della MRM e stabilirne al contempo l'utilità prognostica. Questi studi hanno permesso di dimostrare come la valutazione quantitativa e la cinetica della MRM siano in realtà molto più importanti rispetto alla sua presenza/assenza. A questo scopo sono state validate diverse metodiche che consentono di valutare le oscillazioni quantitative della MRM nel follow-up clinico del paziente (Donovan et al, 2000; Biondi et al).

I target utilizzati nel monitoraggio della MRM, sono principalmente due: i riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici ed i breakpoints delle traslocazioni cromosomiche neoplasia-specifiche (Braziel et al, 2003).

La valutazione della MRM necessita di tecniche molecolari con sensibilità maggiore rispetto a quella richiesta per l'identificazione della clonalità; la metodica ideale deve essere rapida, poco costosa, standardizzabile e specifica. (Braziel et al, 2003).

Poche tecniche presentano caratteristiche di sensibilità tali da poter essere utilizzate per rilevare la MRM nelle neoplasie linfoproliferative (Braziel et al, 2003); una di queste è l'analisi mediante PCR, che permette di identificare una cellula neoplastica tra 10^2 - 10^3 cellule normali (Vernau e Moore, 1999).

2.3 La PCR nella diagnosi e nel monitoraggio delle neoplasie linfoproliferative

Quando gli studi di valutazione della clonalità vennero condotti per la prima volta sui pazienti umani, fu impiegata con successo l'analisi mediante ibridazione Southern Blot (SB), una metodica sensibile e

specifica, ma afflitta da numerose limitazioni (tra cui lunghezza e complessità di esecuzione), che ne hanno limitato l'utilizzo come tecnica diagnostica pratica (Rezuke et al, 1997; Vernau, 2004). Nonostante la SB risulti adeguata in fase diagnostica nell'identificazione della clonalità e della linea di origine, manca di una sensibilità accettabile per il riconoscimento della malattia residua minima o delle recidive incipienti. Inoltre la necessità di utilizzare una quantità di DNA adeguata per quantità e purezza, rendono questa tecnica poco adatta all'utilizzo clinico pratico (Rezuke et al, 1997; Vernau, 2004).

I problemi legati all'impiego dell'ibridazione SB sono stati superati in medicina umana grazie all'avvento della reazione a catena della polimerasi (PCR) ed al buon esito del suo successivo adattamento per la valutazione della clonalità nelle proliferazioni linfoidi (Rezuke et al, 1997; Medeiros e Carr, 1999).

I test basati sulla PCR sono rapidi, applicabili su piccole quantità di DNA (come biopsie ottenute mediante punch ed aspirati con ago sottile) o su DNA di bassa qualità o solo parzialmente intatto (come quello estratto da tessuti fissati in formalina od inclusi in paraffina) (Rezuke et al, 1997; Vernau e Moore, 1999).

È un test che presenta una quantità minima rilevabile pari allo 0,1% di popolazione clonale linfoide, cioè in grado di identificare una cellula monoclonale in 10^3 cellule policlonali; inoltre, l'utilizzo di target molecolari B o T determina la possibilità di identificare la linea di origine della neoplasia, quando questa non può essere determinata con metodiche immunopatologiche (Vernau e Moore, 1999).

La sensibilità, la semplicità di esecuzione e la possibilità di applicazione su piccole quantità di DNA hanno reso la PCR la metodica molecolare cardine

nella diagnosi e nella prognosi delle neoplasie linfoproliferative (Rezuke et al 1997).

La necessità di individuare la MRM, quantificarla ed utilizzarla nel follow-up clinico di ogni paziente, ha determinato un enorme sviluppo delle tecniche basate sulla PCR, volte a migliorarne ulteriormente la sensibilità. Una delle applicazioni più importanti che offre la PCR è quella di amplificare un prodotto derivato dai riarrangiamenti genici clonali delle Ig e del TCR, avvalendosi di primer consenso e di utilizzare tale prodotto, per il sequenziamento genetico. La possibilità di conoscere la sequenza genetica originale della neoplasia di ogni singolo paziente, ha permesso di costruire sonde paziente-specifiche (Brisco et al, 1996; Provan et al, 1996), determinando un incremento della sensibilità notevole (riconoscimento di una cellula monoclonale su 10^5 cellule policlonali) (Jilani et al, 2006).

L'applicazione della PCR precedentemente descritta, presenta tuttavia dei limiti legati alla complessità di esecuzione e ai costi del sequenziamento e della successiva creazione di sonde paziente-specifiche marcate. Inoltre la difficoltà di monitoraggio di alcune neoplasie linfoidi, caratterizzate da continue mutazioni nei cloni neoplastici, rendono le sonde paziente-specifiche non sempre in grado di identificare la presenza di un clone neoplastico residuo. Recentemente, Jilani e collaboratori (2006), hanno applicato una metodica semplice che permette di ridurre i costi e la complessità di esecuzione, migliorando al contempo la sensibilità nell'individuazione della MRM. Tale tecnica combina la PCR alla Ligase Chain Reaction (LCR): i prodotti ottenuti con PCR attraverso primer consenso in fase diagnostica, vengono digeriti con enzimi di restrizione ed i frammenti così ottenuti, vengono utilizzati nel follow-up molecolare. La PCR eseguita nel monitoraggio della MRM, può contenere una quantità di prodotto inadeguata per renderne possibile la visualizzazione su gel di

agarosio e, talvolta anche su sequenziatore automatico. Tuttavia, se il prodotto si è formato e perciò se persiste un clone neoplastico, è possibile combinare tale prodotto con i frammenti ottenuti in fase diagnostica, in presenza di una Ligasi. Tale enzima riconosce selettivamente uno stampo (costituito dal prodotto PCR) e ricombina i frammenti solo se lo stampo è perfettamente identico. In questo modo, è possibile visualizzare un prodotto PCR altrimenti non identificabile: tale combinazione PCR/LCR, ha permesso di aumentare la sensibilità della metodica fino al riconoscimento di 1 cellula clonale su 500'000 (5×10^5) (Jilani et al, 2006).

Un' ulteriore evoluzione della tecnica PCR, riguarda la validazione della metodica Real-Time PCR per la ricerca di riarrangiamenti clonali delle Ig e del TCR, nel monitoraggio della MRM. La RT-PCR permette una valutazione quantitativa del clone neoplastico residuo e consente di monitorarne le oscillazioni, durante il follow-up della malattia. La quantificazione della MRM, presenta notevole valenza prognostica poiché consente di suddividere i pazienti in categorie di rischio, in relazione alla quantità di clone neoplastico presente (maggior presenza quantitativa di MRM, maggior rischio di recidiva precoce) (Biondi et al, 2000; Donovan et al, 2000; Uchiyama et al, 2003).

2.3.1 Amplificazione dei riarrangiamenti genetici dei recettori antigene-specifici tramite PCR

Nel primo Capitolo di questo lavoro, è stato descritto il complesso meccanismo di riarrangiamento genico del TCR e delle immunoglobuline, in cui la scelta dei segmenti genici da ricombinare avviene in maniera relativamente casuale, in modo tale che ogni singola cellula B o T sia caratterizzata da un unico pattern di riarrangiamenti recettoriali (Vernau,

2004). In una neoplasia linfoide, al contrario, ogni clone di cellule neoplastiche B o T presenta un unico ed identico riarrangiamento genico delle Ig o del TCR, che può essere utilizzato come marker molecolare specifico di clonalità (Rezuke et al, 1997; Medeiros e Carr, 1999).

A questo scopo, la PCR viene applicata nell'identificazione di riarrangiamenti genici clonali in quei segmenti di DNA che codificano per le regioni variabili dei geni delle Ig e del TCR, amplificando le V(D)J splice junctions di entrambi i tipi di recettore.

L'eterogeneità dell'aggiunta (e della delezione) dei nucleotidi N nei punti di giunzione tra i segmenti genici V, D e J, determina un *fingerprint* esclusivo per ogni dato riarrangiamento che offre un bersaglio sensibile e specifico per l'amplificazione mediante PCR (Rezuke et al, 1997; Vernau e Moore, 1999; Cazzaniga e Biondi, 2005).

Il riarrangiamento clonale dei segmenti VDJ della catena pesante delle Ig è tipico delle neoplasie linfoidi a cellule B e può essere amplificato mediante PCR utilizzando primer che legano il segmento genico V ed il segmento genico J della regione variabile delle catene pesanti delle Ig.

La Figura 11 mostra come si realizza, mediante PCR l'amplificazione genica dei riarrangiamenti immunoglobulinici.

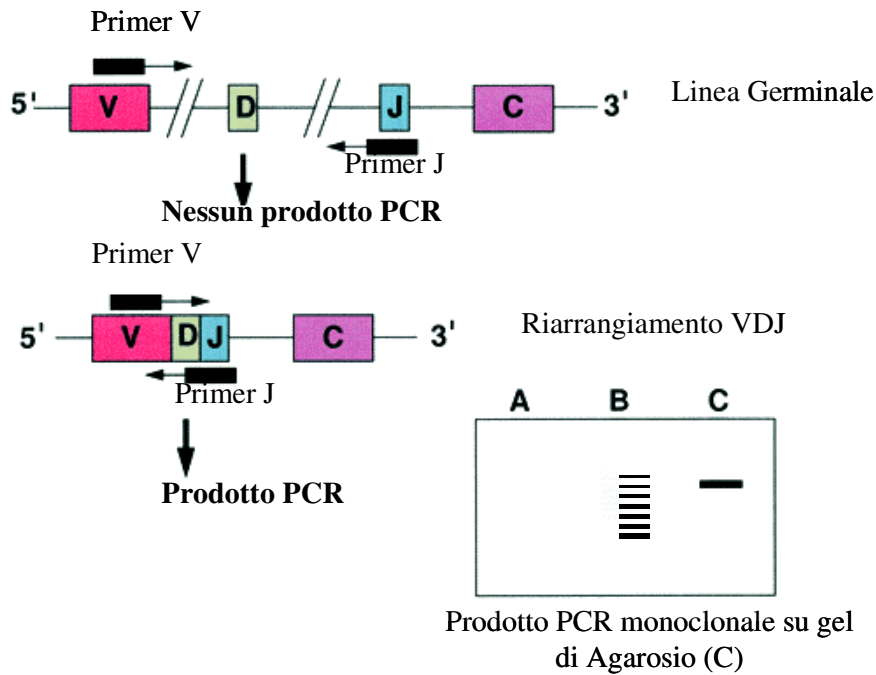


Figura 11 Illustrazione schematica del funzionamento della PCR nell'identificazione di un riarrangiamento genico B. Da Rezuke et al; 1997, modificato.

Per amplificare con successo un segmento di DNA, i primer utilizzati devono riconoscere sequenze geniche poste all'interno di una corta sequenza di DNA. Nello schema genico della linea germinale, le sequenze target dei primer all'interno dei segmenti genici V e J sono ampiamente separate per l'assenza dei riarrangiamenti genici, perciò non è possibile ottenere alcun prodotto amplificato (Figura 11, linea A); soltanto in caso di riarrangiamento VDJ, la vicinanza dei segmenti genici permette l'amplificazione di un prodotto.

In una popolazione policlonale, ciascuna cellula presenta una diversa specificità antigenica ed un distinto riarrangiamento genico, pertanto, il prodotto amplificato, visualizzato mediante elettroforesi, è rappresentato da

bande (frammenti) di diversa lunghezza risultanti in uno *smear pattern* (Figura 11, linea B).

In una popolazione monoclonale al contrario, tutte le cellule presentano identici riarrangiamenti, per cui il prodotto amplificato è rappresentato da una singola banda discreta (Figura 11, linea C) (Rezuke et al, 1997).

Come già detto in precedenza, nei linfociti B, la regione variabile della catena pesante (VH) è costituita da 3 regioni framework, in cui sono presenti sequenze nucleotidiche conservate e da 3 regioni CDR, in cui sono presenti sequenze ipervariabili di DNA che codificano per la regione legante l'antigene e che sono sottoposte al processo di ipermutazione somatica. CDRI, CDRII e tutte le regioni FR sono codificate dal segmento genico V, mentre la CDRIII viene codificata dal segmento genico D e dai segmenti di DNA posti tra le giunzioni V-D e D-J.

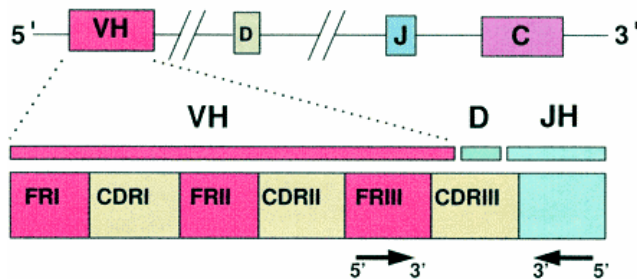


Figura 12 Organizzazione genetica della regione variabile delle Immunoglobuline. Da Rezuke et al, 1997.

I metodi comunemente impiegati in Medicina Umana riguardano l'amplificazione della regione CDRIII della catena pesante delle Ig, utilizzando come sonde, degli oligonucleotidi che presentano omologia con

le sequenze conservate della regione FR_{III} dei segmenti genici V_H e con quelle dei segmenti genici J_H (Ramasamy et al, 1992) .

La costruzione di primer, disegnati in accordo alla sequenza della CDR3 del clone neoplastico d'esordio, rende più sensibile la rilevazione delle cellule neoplastiche e può essere utilizzato per lo studio della MRM.

Nella valutazione delle neoplasie B-cellulari, l'utilizzo di questi primer permette di identificare la clonalità nel 50-60% dei casi; in una buona percentuale di pazienti, in effetti, l'amplificazione di VDJ può non riuscire, a causa di mutazioni che non permettono un corretto *annealing*, o perché, essendo la costruzione di questi primer basata su un limitato numero di sequenze IgH, non è possibile legare tutti i possibili segmenti VH (Rezuke et al, 1997).

Per aumentare la sensibilità di tale tecnica, è possibile amplificare un segmento di DNA più grande, utilizzando dei primer complementari alla regione FRI, posta più esternamente rispetto alla FR III (Figura 12); quest'ultima presenta una sequenza sufficientemente conservata da rendere possibile l'utilizzo di un solo primer, diversamente dalla regione FRI che richiede, per la sua eterogeneità, l'utilizzo di sette differenti primer, che corrispondono alle 7 famiglie di geni VH, identificate in medicina umana (Ramasamy et al, 1992).

Nonostante la maggior complessità di esecuzione, utilizzando la regione FRI, è possibile individuare riarrangiamenti genici delle immunoglobuline nel 94% delle neoplasie linfoidi a cellule B e quindi di ridurre, rispetto al primo metodo, il numero di falsi negativi (Ramasamy et al, 1992).

Per quanto riguarda le neoplasie a cellule T, poiché i geni del TCR α sono molto complessi e i geni del TCR δ sono spesso deleti nelle cellule T mature, il TCR γ e il TCR β rappresentano i più efficienti target per l'amplificazione mediante PCR (Rezuke et al, 1997).

In medicina umana, lo studio sulla clonalità delle neoplasie linfoproliferative a cellule T, viene eseguita mediante l'analisi del locus γ (TCR γ) che fornisce un rendimento diagnostico migliore di quella del locus β (TCR β); questo vantaggio è dato dal fatto che il locus γ viene sottoposto a riarrangiamenti genici con maggiore frequenza nelle cellule T, indipendentemente dall'espressione del TCR di superficie. Inoltre, il numero limitato dei segmenti genici V e la mancanza dei segmenti genici D, rendono il locus γ , più semplice da studiare per selezionare i primer ed ottimizzare la PCR (Theodorou et al, 1996; Rezuke et al, 1997).

I riarrangiamenti del locus γ risultano più semplici da rilevare rispetto a quelli del TCR β e rappresenterebbero pertanto una misura più sensibile di clonalità rispetto ai riarrangiamenti del TCR β (Burnett et al, 2003).

2.3.2 Limiti della PCR nella valutazione della clonalità e della MRM

Nonostante i numerosi vantaggi della PCR nella valutazione della clonalità B e T-cellulare, tale tecnica risulta associata ad un'alta percentuale di risultati falsi-negativi.

Come già accennato, il mancato *annealing* dei primer diretti contro le regioni FRIII e FRI in una significativa percentuale di neoplasie linfoproliferative a cellule B, può essere dovuto a mutazioni somatiche all'interno delle regioni FRI e FRIII che impediscono il corretto annealing dei primer.

L'ipermutazione somatica coinvolge i segmenti genici V e J ed è un processo che si realizza nelle cellule B mature dopo la loro esposizione all'antigene.

Pertanto, nei linfomi che derivano dalle cellule B che non sono state ancora esposte all'antigene (come quelle dello strato mantellare), il processo di

ipermutazione somatica non è significativo ed i falsi negativi non costituiscono un problema.

Viceversa, nei linfomi che derivano da cellule che sono state esposte all'antigene (come ad esempio quelli follicolari) il processo di ipermutazione somatica è sostanziale ed i falsi negativi possono risultare superiori di numero (Rezuke et al, 1997).

Le altre cause responsabili della comparsa di falsi negativi sono rappresentate dall'inabilità dei primer V di riconoscere le sequenze complementari di DNA nei segmenti genici V o ancora dall'incapacità dei primer V e J di riconoscere alterazioni genetiche quali riarrangiamenti parziali (riarrangiamenti DJ) o traslocazioni cromosomiche (Rezuke et al, 1997). In medicina umana la presenza di riarrangiamenti parziali è molto frequente nella leucemia linfoblastica acuta infantile, dove arriva a rappresentare oltre il 20% dei casi (Cazzaniga e Biondi, 2005). Così come in fase diagnostica tali limitazioni possono essere rilevate anche nella valutazione della MRM, nella quale peraltro, la percentuale di falsi negativi può aumentare sensibilmente. In effetti, la stabilità dei marker in corso di neoplasia non è assoluta e i prodotti tumorali presenti negli stadi iniziali della patologia possono essere assenti nei cloni cellulari responsabili della recidiva. Questa instabilità è generalmente dovuta al fatto che il marker identificato al momento della diagnosi, è presente solamente in un subclone di cellule neoplastiche, che può non essere il responsabile della progressione della patologia e della successiva ricaduta: questo fenomeno è noto con il nome di *oligoclonalità* (Cavè, 1999; Paietta, 2002).

Un'altra possibilità è che il marker clonale possa essere modificato da un riarrangiamento genico secondario. Questo fenomeno prende il nome di *evoluzione clonale* (Cavè, 1999).

Sebbene il rilevamento della MRM possa essere ostacolata dall'instabilità dei marker e dalla probabilità di cambiamento nel pattern dei riarrangiamenti durante l'evoluzione della neoplasia, il rischio di un risultato falso negativo è basso quando lo studio della MRM viene condotto durante gli stadi precoci del trattamento (Cavè, 1999).

CAPITOLO 3:

I riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici nelle neoplasie linfoproliferative canine

3.1 Introduzione

Com'è noto da tempo, le neoplasie linfoproliferative canine presentano, seppur con differenze specie-specifiche, un'alta similitudine con la controparte umana, tanto che il cane è stato più volte proposto come modello sperimentale spontaneo per lo studio di queste neoplasie (Knapp e Waters, 1997; Vail e McEwen, 2000; Gentilini et al, 2005).

In Medicina Veterinaria la diagnosi di neoplasia linfoproliferativa, viene effettuata in prima istanza attraverso la valutazione morfologica dei preparati cito/istologici, che solitamente è in grado di individuare e classificare una neoplasia linfoide; tuttavia, gli stessi errori diagnostici e limiti interpretativi riscontrati in Medicina Umana, sono presenti anche in Medicina Veterinaria. Analogamente alla controparte umana, gli studi immunopatologici hanno contribuito a migliorare il protocollo diagnostico e la classificazione dei linfomi canini, poichè l'avvento delle tecniche di biologia molecolare è troppo recente per poter coadiuvare il percorso diagnostico clinico o avanzare ipotesi patogenetiche. Nondimeno, negli ultimi 8 anni, l'interesse nella validazione di marker molecolari di neoplasia ha prodotto diversi studi, soprattutto rivolti alla valutazione della clonalità in corso di neoplasie linfoproliferative canine (Vernau e Moore, 1999; Burnett et al, 2003; Avery e Avery, 2004; Vernau, 2004; Tamura et al, 2006; Yagihara et al, 2007). Sono stati effettuati anche alcuni studi di

citogenetica e recentemente è stato dato inizio ad un progetto di valutazione dell'espressione genica dei linfomi su di un'ampia casistica, sebbene l'applicazione clinica diagnostica e prognostica delle traslocazioni cromosomiche appaia ancora lontana. (Thomas et al, 2003; Modiano, 2004).

La presenza di differenze specie-specifiche tra la genetica delle immunoglobuline nell'uomo e nel cane implicano spesso approcci differenti o in ogni caso non del tutto sovrapponibili.

Un esempio evidente è l'utilizzo della clonalità delle catene leggere come marker di neoplasia linfoproliferativa che viene effettuato in Medicina Umana: la possibilità di utilizzare le catene leggere a scopo diagnostico è possibile poiché fisiologicamente le catene di isotipo κ e λ si trovano in rapporto di equilibrio, per cui l'identificazione di linfociti B che esprimono in predominanza un isotipo piuttosto che un altro è indicativa di una popolazione monoclonale (Rezuke et al, 1997).

In Medicina Veterinaria, la fisiologica predominanza della catena leggera λ (in rapporto 90% a 10%) rende difficile il suo utilizzo come marker di clonalità a meno che non venga dimostrata, tramite metodiche immunopatologiche, la completa positività anticorpale verso la catena leggera λ associata alla negatività anticorpale verso la catena leggera κ (Arun et al, 1996; Avery e Avery, 2004; Vernau, 2004).

3.2 Identificazione dei primer consenso per la ricerca della clonalità nelle neoplasie linfoidi B canine

Nella diagnostica molecolare dei linfomi canini per l'amplificazione della regione variabile delle Immunoglobuline (VH) si utilizzano primer consenso, ossia sequenze costruite su nucleotidi altamente conservati nella

regione target. I primi primer consenso validati in Medicina Veterinaria, risalgono al 2003, quando Burnett e collaboratori (2003), li disegnarono su sequenze di DNA complementare (cDNA), ottenute tramite retrotrascrizione dell' RNAm estratto da una milza di cane sano. Il cDNA fu clonato, sequenziato e successivamente allineato, evidenziando la presenza di 5 sequenze con differenze significative (5 cloni). Nonostante le diversità riscontrate, tutti e 5 i cloni presentavano una sequenza altamente conservata in corrispondenza della FRIII putativa che poteva essere amplificata, tramite PCR, da un unico primer comune VH(primer *forward*); tali cloni contenevano altresì due sequenze altamente conservate a livello della regione J putativa, amplificabili tramite 2 diversi primer JH (primer *reverse*). Secondo gli autori il primer forward e i due primer reverse, non potevano essere combinati in un'unica reazione, pertanto le reazioni di amplificazione della regione variabile delle Ig, in relazione al primer J utilizzato furono designate *IgH maior*, in grado di amplificare la maggioranza dei riarrangiamenti genici possibili ed *IgH minor*, in grado di amplificare solo una piccola proporzione di essi. Il set di primer così ottenuto, è stato contestualmente utilizzato su campioni diagnostici, determinando l'identificazione di una popolazione clonale nel 91% delle neoplasie linfoidi testate (Burnett et al, 2003).

Successivamente all'avvento del completo sequenziamento del genoma canino, un ulteriore studio basato sull'analisi informatica delle sequenze depositate sui database, scaturiti dal completamento degli studi genetici sul cane, ha ridefinito i primer da utilizzare nella ricerca della clonalità B-cellulare (Tamura et al, 2006). Confrontando le sequenze di cDNA del locus H depositate in precedenza, con tutte le sequenze genomiche della regione variabile delle immunoglobuline canine, presenti sui database, i ricercatori sono stati in grado di individuare un singolo gene, posto sul

cromosoma 8, contenente 61 diversi segmenti genici V ed un solo segmento genico J. Allineando i 61 segmenti genici V, è stato possibile identificare, in corrispondenza della FRIII, una sequenza altamente conservata di 20 nucleotidi; su questa e sull'unico segmento J sono stati disegnati i primer in grado di amplificare, mediante PCR, la regione ipervariabile CDRIII, consentendo la valutazione della clonalità nei linfomi canini, con un'unica coppia di primer (Tamura et al, 2006).

3.3 Identificazione dei primer per l'amplificazione genica del TCR

Lo stesso criterio utilizzato per l'identificazione della clonalità B, è stato utilizzato da Burnett e collaboratori (2003) per il TCR. La decisione di indirizzare le ricerche sul locus γ , è stata dettata dalle stesse considerazioni effettuate in Medicina Umana, già descritte nel precedente Capitolo di questa tesi. Il metodo utilizzato per l'acquisizione del cDNA dal timo di un cane sano e la successiva creazione dei primer è stato lo stesso utilizzato per le Immunoglobuline. Anche in questo caso i ricercatori hanno ottenuto 5 cloni sui quali, ricercando le sequenze conservate, sono stati disegnati i primer. Così come per le Immunoglobuline anche il locus TCR, è stato amplificato attraverso un primer *forward* comune V e due primer *reverse*, J γ . A differenza del set di primer per le Ig, i tre primer sono stati utilizzati nella stessa reazione. Anche in questo caso l'utilizzo di queste sonde è stata in grado di determinare la presenza di una popolazione linfoide nei campioni sottoposti ad indagine molecolare (Burnett et al, 2003).

Come in precedenza, anche in questo caso il gruppo di ricercatori giapponesi autori dello studio basato sul genoma canino, ha utilizzato lo stesso criterio investigativo applicato sui linfomi B, al TCR canino, arrivando ad avanzare un'ipotesi sull'organizzazione genetica dell'intero

locus γ (Yagihara et al, 2007). In questo studio sono stati identificati 22 cloni codificanti il TCR canino attraverso i quali, tramite analisi computerizzata del database genetico del cane, è stato possibile identificare almeno 4 repertori di regioni V, appartenenti a due distinti sottogruppi, e 6 regioni J anch'esse suddivisibili in 2 sottogruppi, in base a similitudini di sequenza (Yagihara et al, 2007). Questi dati hanno permesso la creazione di 4 primer ognuno dei quali specifico per ogni sottogruppo: la combinazione delle quattro sonde identificate ha permesso di individuare una popolazione clonale nella totalità dei campioni neoplastici testati (11 linfomi e leucemie T), distinguendoli da campioni iperplastici e sani (Yagihara et al, 2007).

3.4 Sensibilità della PCR nella valutazione della clonalità dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici nelle neoplasie linfoproliferative canine

L'applicazione pratica ad un ampio studio casistico delle tecniche PCR validate in Medicina Veterinaria ha permesso di valutarne pregi e limiti. Come accennato precedentemente, nello studio eseguito da Burnett e collaboratori (2003), la sensibilità della PCR nella valutazione della clonalità delle neoplasie linfoidi B e T canine è stata approssimativamente del 90% (77 campioni positivi a PCR su 101 soggetti inclusi nello studio per diagnosi citomorfologica di neoplasia linfoproliferativa). Tale sensibilità si è dimostrata molto più alta di quella ottenuta in analoghi studi sull'uomo (Vernau, 2004).

Gli stessi autori hanno tuttavia evidenziato come la tecnica PCR da loro validata presenti una diversa sensibilità quando utilizzata su campioni provenienti da tessuti linfoidi od ottenuti da tessuti non linfoidi. Nel tessuto

linfoide, la PCR è molto sensibile e presenta una quantità minima rilevabile di 1 cellula neoplastica su 1000 (Burnett et al.; 2003); al contrario nel tessuto non linfoide, la sensibilità è risultadecisamente inferiore (1 linfocita neoplastico in una popolazione di 100 linfociti non neoplastici) (Lana et al, 2006). Una possibile spiegazione riguarderebbe la competizione, durante l'amplificazione, tra le sequenze geniche riarrangiate dei linfociti normali e il DNA neoplastico (Burnett et al, 2003).

La PCR diagnostica, per avere un valido riscontro pratico deve in ogni caso poter essere applicata a matrici diagnostiche anche molto diverse tra loro. Burnett e collaboratori hanno dimostrato come la tecnica PCR potesse essere applicabile a qualsiasi matrice biologica: campioni biotici, fluidi cavitari, ago-aspirati, midollo osseo, e materiale citologico.

Anche nell'applicazione su sangue periferico, la PCR per la ricerca della clonalità linfoide si è dimostrata più sensibile rispetto alla valutazione citomorfologica nell'identificazione di una popolazione clonale. Nello studio di Keller e collaboratori (2004), il 76% dei soggetti affetti da linfoma in stadio clinico III/V o VI/V hanno presentato una positività PCR su sangue periferico, nonostante la valutazione citomorfologica eseguita contestualmente su midollo e sangue fosse risultata negativa. Tale riscontro molecolare, ha permesso la collocazione di questi soggetti nel V stadio WHO (coinvolgimento neoplastico del midollo), che non sarebbe stata possibile con il solo ausilio delle tecniche morfologiche tradizionali. Tuttavia, tale positività non ha costituito un fattore prognostico negativo nel follow-up clinico dei pazienti (Lana et al, 2006).

Nonostante i numerosi vantaggi della PCR nella valutazione della clonalità B e T cellulare, anche negli studi sul cane, la tecnica ha dimostrato di essere associata a risultati falsi negativi e falsi positivi.

Di conseguenza, la valutazione della clonalità deve essere sempre interpretata insieme ai riscontri clinici, morfologici ed immunofenotipici e nel rispetto dei limiti di sensibilità e di specificità della tecnica utilizzata (Avery e Avery 2004).

La mancanza di riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici nei casi di neoplasia linfoide confermata (falsi negativi) può essere dovuto a varie cause.

E' possibile che i primer comunemente utilizzati nel cane e nell'uomo non siano in grado di riconoscere tutte le possibili ricombinazioni VDJ: pertanto, una neoplasia linfoide che presenti ricombinazioni VDJ tali per cui i primer utilizzati non sono in grado di riconoscere alcuna sequenza nucleotidica ad essi complementare, potrebbe produrre un risultato falso negativo all'indagine PCR.

Il sequenziamento del genoma canino ha permesso di stabilire con quale grado i primer comunemente utilizzati riescano a riconoscere le ricombinazioni VDJ (Avery e Avery 2004); tale riscontro, ha consentito di perfezionare la tecnica PCR, tramite la costruzione di nuovi primer in grado di assicurare una "copertura" più completa di tutti i possibili riarrangiamenti (Vernau, 2004).

E' possibile inoltre, che il "fallimento" dei primer diretti contro la regione FRIII in una significativa percentuale di neoplasie linfoproliferative a cellule B, possa essere dovuto a mutazioni somatiche all'interno della regione variabile riarrangiata delle Ig che impediscono il corretto *annealing* dei primer (Vernau, 2004).

In Medicina Umana, quest'ultimo problema è stato superato tramite la creazione addizionale di primer consenso diretti verso le regioni FRI e FRII, in aggiunta a quelli utilizzati per l'amplificazione dei riarrangiamenti del locus della catena leggera κ delle Ig. I riarrangiamenti delle Ig κ non

sono, infatti, sottoposti al processo di ipermutazione somatica e perciò sono ritenuti target stabili per l'amplificazione mediante PCR (Vernau, 2004).

Un'altra causa di falsa negatività all'indagine PCR, può essere legata alla natura della neoplasia stessa: alcune neoplasie linfoproliferative derivano da cellule Natural Killer in altre parole da linfociti privi di recettore (anche dette cellule non-B, non-T), pertanto, non è presente né identificabile alcun riarrangiamento genico. Un altro esempio è rappresentato dalle neoplasie linfoidi che coinvolgono i precursori dei linfociti che presentano la configurazione genetica della linea germinale: anche in questo caso l'assenza di riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici, non permette l'amplificazione del prodotto PCR (Avery e Avery, 2004).

Nello studio di Lana e collaboratori (2006), allo scopo di determinare se i risultati falsi negativi fossero legati alla presenza di una particolare neoplasia oppure ad un limite della tecnica, sono stati confrontati i tempi di sopravvivenza e i Disease Free Interval (DFI/ intervallo libero da malattia) dei pazienti affetti da linfoma che hanno mostrato riarrangiamenti genici clonali e quelli che, viceversa sono risultati falsi negativi; la mancanza di una differenza significativa dei DFI e dei tempi di sopravvivenza tra i due gruppi ha indotto ad ipotizzare che la causa dei risultati falsi negativi fosse da imputare al mancato annealing dei primer consenso (Lana et al, 2006).

E' infine possibile che i risultati falsi negativi possano essere legati alla presenza di un numero di cellule neoplastiche inferiore alla quantità minima rilevabile dalla PCR (1 cellula neoplastica su 100 o 1000 linfociti normali) (Avery e Avery 2004). Questa eventualità si verifica soprattutto quando i campioni che sono sottoposti ad indagine molecolare, provengono da soggetti in remissione clinica anziché in ammissione: quest'ultima considerazione costituisce un limite significativo all'utilizzo di questi

primer nella valutazione della Malattia Residua Minima (Avery e Avery, 2004).

Alcune neoplasie linfoidi possono mostrare riarrangiamenti genici biclonali o multipli (pattern oligoclonale) dello stesso recettore antigene-specifico (Avery e Avery 2004). Per analogia a quanto osservato in Medicina Umana, è possibile che il riarrangiamento biclonale dello stesso recettore antigene-specifico sia determinato dall'esistenza di due popolazioni di cellule neoplastiche o dalla presenza di riarrangiamenti non produttivi sul secondo cromosoma (fenomeno di mancata esclusione allelica) (Burnett et al, 2003).

I riarrangiamenti multipli potrebbero essere indotti dalla trasformazione della neoplasia in cloni multipli che hanno subito successivi riarrangiamenti CDR3 (come descritto per il linfoma a cellule B nell'uomo) o dalla presenza di cloni multipli generati per stimolazione di un processo trasformante, quale l'esposizione ad un carcinogeno o il risultato di un processo virale (come descritto per l'infezione umana da HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus-1) (Burnett et al, 2003; Avery e Avery 2004).

3.5 Specificità della PCR nella valutazione della clonalità dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici nelle malattie linfoproliferative canine

L'analisi dei prodotti PCR mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide, non sempre permette una facile differenziazione tra riarrangiamenti genici monoclonali ed oligoclonali o policlonali; è quanto accade quando viene utilizzato il TCR γ , per la valutazione della monoclonalità nelle malattie linfoproliferative T (Avery e Avery, 2004). Come precedentemente riportato, il locus γ viene maggiormente utilizzato perché oltre a fornire un

rendimento diagnostico superiore rispetto al locus β , presenta un limitato numero di segmenti genici V sottoposti al processo di ricombinazione; a causa di questa minore eterogeneità tra i riarrangiamenti genici, il TCR γ costituisce un sistema più semplice per la costruzione di primer consenso, ma per lo stesso motivo in grado di indurre la comparsa di risultati falsi positivi (Vernau e Moore, 1999; Vernau, 2004). Alcuni campioni provenienti da soggetti non affetti da neoplasia linfoide possono mostrare riarrangiamenti genici clonali: è il caso di alcune infezioni (tra cui l'Ehrlichiosi sostenuta da *E.canis*) che sono in grado di indurre un riarrangiamento clonale T (Vernau e Moore, 1999; Burnett et al.; 2003).

Tale popolazione monoclonale od oligoclonale, sarebbe indotta dalla presenza di cellule T trasformate ma non ancora evolute verso un evidente stato neoplastico, (come già precedentemente descritto nell'infezione da visus HTLV in Medicina Umana) oppure da una popolazione di cellule T iperplastiche reattive, che recederà successivamente (come l'infezione da virus di Epstein-Barr) (Burnett et al.; 2003). Nessuno studio in Medicina Veterinaria, ha valutato il decorso clinico di cani positivi a PCR per riarrangiamenti clonali T in corso di Ehrlichiosi o altre patologie infiammatorie per la possibile insorgenza di neoplasie linfoidi conclamate (Avery e Avery 2004). Tale considerazione è particolarmente importante quando i risultati PCR vengono designati come falsi positivi solo sulla base di risultati citologici o istologici negativi e non nel rispetto dell'eventuale decorso clinico. In uno studio sull'uomo, 80 casi di iperplasia linfoide benigna o atipica sono stati testati per la valutazione della clonalità, e tutti i pazienti che hanno mostrato riarrangiamento genico clonale T o B hanno sviluppato una neoplasia entro i due anni (Avery e Avery 2004).

La "pseudoclonalità" rappresenta un'altra causa di risultati falsi positivi, determinata dall'utilizzo di primer consenso. Essa si verifica quando il

campione testato contiene pochi linfociti (es. un tessuto non linfoide) o DNA di scadente qualità (es. un tessuto fissato in formalina). In questi casi, il DNA può essere amplificato solo da un piccolo numero di linfociti normali e dare così l'impressione della presenza di una popolazione linfocitaria clonale. Per limitare il fenomeno della pseudoclonalità, è quindi importante testare la sensibilità e la specificità della tecnica utilizzata nelle differenti matrici diagnostiche (in particolare tessuto fissato in formalina contro tessuto fresco) (Avery e Avery 2004).

3.6 Determinazione della linea di origine delle neoplasie linfoidi mediante scoperta dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici.

Nell'uomo e nel cane, l'analisi clonale dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici può essere utilizzata anche per contribuire all'accurata assegnazione della linea di origine delle neoplasie linfoidi, in particolare nei casi in cui le tecniche immunopatologiche non risultino esaustive. Questa possibilità è soprattutto importante considerando la valenza prognostica della linea di origine nelle neoplasie linfoproliferative canine (Vail, 2000).

Il riscontro di un riarrangiamento genico del TCR è considerato sufficiente a giustificare la definitiva classificazione della neoplasia come appartenente alla linea cellulare T, con una certezza paragonabile al valore dei riarrangiamenti delle Ig nelle neoplasie linfoidi B (riarrangiamenti genici di linea appropriata). Sebbene queste conclusioni siano considerate generalmente vere, non possono valere in senso assoluto se prese singolarmente: l'interpretazione dei risultati ai fini dell'assegnazione della

linea di origine deve essere effettuata con cautela (Vernau, 2004). Risultano di dubbia interpretazione anche quei casi dove si verificano entrambi i tipi di riarrangiamento genico dei recettori antigene-specifici (sia T che B): non è chiaro in effetti se si possa trattare di una doppia clonalità neoplastica o se si debba considerare la possibilità di un risultato falso positivo su una delle due linee cellulari (Burnett et al.; 2003).

L'identificazione tramite PCR dei riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici, può senz'altro consentire la diagnosi più accurata delle neoplasie linfoproliferative in Medicina Veterinaria e potrebbe essere impiegata anche come marker di MRM. La possibilità di monitorare con tecniche molecolari tali neoplasie, apporterebbe senz'altro notevoli miglioramenti nella comprensione della patogenesi e dell'evoluzione di queste neoplasie che, come noto, nel 90% dei casi recidivano invariabilmente entro due anni: tali studi potrebbero altresì consentire di modulare il trattamento terapeutico, al fine di ottenere remissioni più durature. Un tentativo preliminare di applicare un approccio molecolare finalizzato alla valutazione della MRM è stato impiegato recentemente dal nostro gruppo di ricerca. I risultati di questa tesi comprendono ed ampliano le strategie, i metodi ed i risultati di questo approccio.

Sperimentazione

Premessa

Il presente studio sperimentale è stato condotto su campioni biologici ottenuti da 107 cani affetti da linfoma afferiti al Dipartimento Clinico Veterinario dell'Università di Bologna da Gennaio del 1997 ad Agosto del 2006.

Le linee di ricerca applicate sono state due, pertanto il lavoro sperimentale è stato suddiviso in due parti: diagnosi molecolare di linfoma e prognosi molecolare di linfoma.

La prima parte, ha avuto come obiettivo il miglioramento della sensibilità e della specificità nella diagnosi molecolare di linfoma canino, con particolare riferimento alle matrici più comunemente ottenute in prima linea nel protocollo diagnostico clinico (aspirazioni con ago sottile; AAS). La seconda parte ha avuto come obiettivo, l'applicazione delle metodiche di biologia molecolare al fine di individuare la Malattia Residua Minima nei cani affetti da linfoma e sottoposti a trattamento antitumorale, attraverso matrici diagnostiche di semplice reperimento ottenute tramite tecniche di prelievo minimamente invasive. Le ipotesi sperimentali, i metodi utilizzati ed i risultati ottenuti sono riportati nei Capitoli successivi.

CAPITOLO 4:

Materiali e metodi

Parte I: Diagnosi molecolare di linfoma

4.1 Introduzione

In questo studio sono stati analizzati i campioni provenienti da 107 cani affetti da linfoma giunti in visita presso il Dipartimento Clinico Veterinario nel periodo compreso tra Gennaio 1997 ed Agosto 2006.

In tutti i casi la diagnosi di linfoma è stata ottenuta mediante esame citologico e/o istologico dei tessuti interessati dal processo patologico. I preparati così ottenuti sono stati successivamente sottoposti ad estrazione del DNA ed utilizzati per la ricerca di riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici tramite PCR e successiva visualizzazione con elettroforesi capillare.

4.2 Criteri di inclusione

I casi clinici inclusi in questo studio sono stati selezionati in modo retrospettivo analizzando il database delle patologie linfoproliferative del Dipartimento Clinico Veterinario. Il primo criterio di inclusione utilizzato ha riguardato la diagnosi citologica e/o istologica di linfoma. La diagnosi citologica dei soggetti afferiti al Dipartimento da Gennaio 2000 ad Agosto 2006 è stata effettuata attraverso la lettura e l'interpretazione dei preparati eseguita in modo indipendente da almeno due patologi clinici del Dipartimento Clinico; i casi antecedenti tale periodo (1997-2000) sono stati inclusi in questo studio pur non essendo stati valutati dallo stesso personale, per la presenza di un referto citologico indicativo di linfoma. Nei casi in cui siano state effettuate sia l'indagine citologica che istologica,

quest'ultima è stata ritenuta l'esame di riferimento, pertanto, la mancata concordanza diagnostica tra i due esami ha determinato l'esclusione di quei soggetti con indagine citologica positiva ed istologica negativa. Tra tutti i soggetti selezionati come precedentemente esposto sono stati definitivamente inclusi i soggetti per i quali era disponibile una matrice biologica da sottoporre ad estrazione e successiva amplificazione del DNA.

4.3 Matrici

I campioni patologici disponibili per l'esecuzione della prova sperimentale sono stati 107 (Gruppo soggetti patologici), di cui 102 preparati citologici fissati, colorati e conservati a temperatura ambiente e 5 tessuti bioptici conservati a -20° , non fissati in formalina e non inclusi in paraffina. I tessuti di provenienza di tali campioni erano rappresentati da 91 prelievi citologici linfonodali (linfomi multicentrici), 4 aspirati intestinali (linfomi extranodali a localizzazione enterica), 2 epatici (1 linfoma multicentrico con coinvolgimento epatico ed un linfoma extranodale epatico), 2 tessuti cutanei (2 linfomi extranodali cutanei), 1 mediastinico e 3 splenici (linfomi extranodali a localizzazione splenica), 3 aspirati midollari (linfomi multicentrici in V stadio WHO) e un'impronta da biopsia gastrica (linfoma extranodale gastrico). Sono stati altresì selezionati 5 tessuti linfonodali ottenuti in sede autoptica da soggetti morti per cause non correlabili al processo patologico oggetto di questo studio (avvelenamento stricnico e da rodenticidi) e denominato Gruppo di controllo Sani e 5 tessuti linfonodali provenienti rispettivamente da 3 cani affetti da Leishmaniosi e 2 cani affetti da Ehrlichiosi (Gruppo di controllo Iperplastici).

4.4 Estrazione del DNA

IL DNA dai campioni citologici è stato ottenuto tramite raschiamento con lama di bisturi del materiale fissato e colorato nel preparato citologico e sottoposto a successiva estrazione con Kit commerciale (Qiamp DNA

micro kit, Qiagen®, Protocollo *Isolation of genomic DNA from dried blood spots*”, fornito dal produttore).

I campioni istologici ottenuti in sede autoptica o prelevati tramite Tru-cut sono stati pesati e successivamente lisati secondo il seguente protocollo: 100mg di tessuto + 100µl di tampone di lisi (Tris HCl 1M, pH 8, EDTA 0,5M, NaCl 5M e SDS 10%) + 5 µl di proteinasi K (10mg/ml). Al termine dell’incubazione (2 ore a 55°C e poi 37°C O/N) i campioni sono stati sottoposti ad estrazione con Kit commerciale (Qiamp DNA micro kit, Qiagen®, protocollo *Isolation of genomic DNA from tissues*, fornito dal produttore).

4.5 PCR

4.5.1 Primer di controllo C μ : adeguatezza dell’estrazione del DNA.

Per ogni campione è stato previsto un controllo DNA positivo rappresentato da 2 primer diretti contro l’esone 1 del segmento genico C μ , che codifica per la regione costante delle Immunoglobuline e del TCR. Tali primer sono stati ottenuti da bibliografia (Burnett et al, 2003) ed acquistati, marcati all’estremità 5’ con il fluoroforo HEX (Invitrogen®, Milano). Tutti i campioni dei soggetti inclusi in questo studio sono stati analizzati in prima istanza con questi primer per verificare la validità dell’estrazione del DNA. La presenza di un prodotto pari a circa 130bp, sanciva la presenza di una quantità di DNA sufficiente per eseguire le prove di clonalità. In caso di assenza del prodotto, il campione veniva automaticamente escluso dalle analisi successive.

4.5.2 Primer per i linfomi B

I primer utilizzati in questo studio sono stati disegnati sui segmenti genici VDJ e perciò in grado di individuare la presenza di un riarrangiamento

genico dei recettori antigene-specifici della linea cellulare B. Tre primer sono stati creati dal nostro gruppo di ricerca mediante studio del database genetico del cane; le modalità di ricerca e le sequenze di tali primer sono stati omessi. Sono stati creati 4 set di primer in grado di determinare quattro prodotti di peso molecolare diverso: si tratta di sequenze geniche, una interna all'altra ottenute mediante 4 primer *forward*, posti sul segmento genico V, due dei quali disegnati dal nostro gruppo di ricerca e denominati **Gufu** e **Gazza**, il terzo ottenuto dallo studio di Burnett e collaboratori (2003), denominato **CB1**, il quarto, dallo studio di Tamura e collaboratori (2006) e chiamato **TamuraF** (vedi Tabella 3). I primer *reverse*, posti sul segmento genico J, sono stati ottenuti da bibliografia (Burnett et al, 2003; Tamura et al, 2006) con l'eccezione di un primer denominato **CB2modificato** ottenuto, come intuibile dal nome, modificando il primer **CB2** (Burnett et al, 2003; vedi Tabella 2).

Tutti i primer sono stati acquistati marcati all'estremità 5' con il fluoroforo 6-FAM (Invitrogen®, Milano).

4.5.3 Primer per i linfomi T

I primer utilizzati per la linea linfoide T sono stati ottenuti da bibliografia (Burnett et al, 2003). Tali primer sono stati disegnati sul TCR γ , come riportato nel precedente Capitolo di questa tesi. Anche in questo caso tutti i primer sono stati acquistati marcati all'estremità 5' con fluoroforo 6-FAM (Invitrogen®, Milano).

Tabella 2 Primer utilizzati per l'amplificazione di C μ (controllo positivo), linea B (IgH Maior e Minor) e TCR γ . (Burnett et al.; 2003; Tamura et al, 2006). La Lettera V, in colore rosso indica la presenza di basi degenerate

prodotto	nome primer	specificità primer	sequenze primer (5'-3')
C μ	C μ 1	C μ 1	TTC CCC CTC ATC ACC TGT GA
	C μ 2	C μ 2	GGT TGT TGA TTG CAC TGA GG
IgH maior	CB1	VH	CAG CCT GAG AGC CGA GGA CAC
	CB2	JH	TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT
IgH minor	CB1	VH	CAG CCT GAG AGC CGA GGA CAC
	CB3	JH	TGA GGA CAC AAA GAG TGA GG
TCR γ	TCR γ 1	JH	ACC CTG AGA ATT GTG CCA GG
	TCR γ 2	JH	GTT ACT ATA AAC CTG GTA AC
			TCT GGG VTG TAV TAC TGT GCT GTC
	TCR γ 3A	VH	TGG
	CDR3	Tamura F	VH
CDR3	Tamura R	JH	TGA GGA GAC GG TGAC C

4.5.4 Reagenti

Nella miscela di reazione sono stati utilizzati i desossiribonucleotidi trifosfati (10 mM dNTP Mix, PCR Grade®, Invitrogen, Milano) e la Taq DNA polimerasi (PLATINUM® Taq DNA polymerase, Invitrogen, Milano), con relativo MgCl₂ e Buffer 10 X.

4.5.5 Miscela di reazione

Tutte le miscele di reazione hanno avuto un volume finale di 25 microlitri. Le miscele di reazione per i primer ottenuti da bibliografia sono state eseguite con le concentrazioni riportate (Burnett et al, 2003; vedi Tabella 3).

Le miscele di reazione per i nuovi primer disegnati, sono state emesse a punto utilizzando diverse concentrazioni di MgCl₂ e primer per ottenere la

maggior efficienza della PCR. Le migliori condizioni di reazione sono state ottenute utilizzando le concentrazioni di 2mM di MgCl₂ e 300nM di primer.

Tabella 3. Quantità (microlitri) dei primer, dei reagenti (dNTPs, Taq e MgCl₂) e di DNA utilizzati per la miscela di reazione del C_μ per un volume finale di 25 microlitri. Esempio di una Mix 16X. Le stesse concentrazioni sono state utilizzate per l'amplificazione di tutti i prodotti ottenuti da bibliografia.

C _μ mix	1 X	16 X
	microlitri	microlitri
Buffer 10x	2.5	40
MgCl ₂ 50 mM	1	16
dNTPs 2.5 mM	2.5	40
C _μ 1 5 microM	2	32
C _μ 2 5 microM	2	32
Taq 5U/microlitro	0.2	3.2
DNA	2.5	
H ₂ O	12.3	196,8

4.5.6 Protocollo di amplificazione

I prodotti PCR, sono stati amplificati mediante termociclatore *Ep Gradient S* (Eppendorf® Dusseldorf, Germania), utilizzando il seguente protocollo, con le dovute modifiche riguardanti la temperatura di *annealing* delle diverse coppie di primer, di volta in volta utilizzate (Step 2).

- Step 1) 95°C x 3 min**
Step 2)
- **94°C x 30 sec**
 - **50- 58°C x 30 sec**
 - **72°C x 30 sec**
- Step 3) 72°C per 30 min**
Step4) 4°C

Il ciclo rappresentato dallo Step 2 è stato ripetuto 35 volte. L'estensione finale di 30 minuti (Step 3) è stata necessaria per la successiva analisi di frammento, in quanto in grado di diminuire l'artefatto "Plus-A", che si verifica quando la Taq DNA Polimerasi aggiunge un nucleotide extra (generalmente un'adenina) al terminale 3' del prodotto PCR. Tale artefatto può determinare difficoltà di analisi del frammento fluorescente soprattutto se tale aggiunta è variabile o incompleta.

4.5.7 Separazione elettroforetica e visualizzazione

Dopo l'amplificazione, i prodotti PCR sono stati addizionati a 6X Loading Dye (Blue/Orange Loading Dye®, Promega), nelle seguenti concentrazioni: 10 microlitri di PCR + 2 microlitri di loading dye; I preparati così ottenuti sono stati sottoposti a separazione elettroforetica su gel di Agarosio al 2,5% con Etidio Bromuro (1µl ogni 50 ml di TBE); infine, insieme ai campioni è stato fatto migrare il marcatore molecolare (100 bp DNA Ladder®, Promega). I prodotti elettroforetici sono stati acquisiti e visualizzati tramite sistema computerizzato (Geldoc 1000, Biorad®).

4.5.8 Prodotti di reazione

I prodotti di reazione attesi, in base a quanto riportato in bibliografia sono di 130 paia di basi circa per la reazione C μ , 120 paia di basi circa per i prodotti B (IgH maior e minor), 90 paia di basi circa per il prodotto di reazione del TCR. Il risultato è stato considerato positivo quando vi era la comparsa di una banda discreta e dominante (popolazione monoclonale) del peso atteso. Il risultato è stato considerato negativo alla comparsa di uno *smear pattern* (popolazione policlonale).

4.6 Analisi di frammento

Gli amplificati ottenuti dalla PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, USA). Tutti i prodotti sono stati opportunamente diluiti, denaturati con formamide (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems®, Foster City, USA) e caricati sul sequenziatore insieme al marcatore molecolare standard di riferimento (GeneScan™ 500-LIZ, Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, USA). I dati ottenuti dal sequenziatore automatico sono stati successivamente analizzati con il software Gene Mapper HID® Vers 3.2 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

4.6.1 Prodotti di reazione dell'analisi di frammento

L'elettroforesi capillare è in grado di distinguere prodotti della differenza di un singolo nucleotide. I prodotti dell'analisi di frammento appaiono come picchi di altezza ed area diversa in dipendenza della quantità del prodotto e del peso, che viene calcolato dal software, rispetto allo standard di riferimento. La presenza di un prodotto derivato da riarrangiamento genico clonale dei recettori antigene-specifici, appare pertanto come un picco a base molto stretta (indicazione di clonalità); la presenza di un prodotto derivato da una popolazione policlonale e quindi costituito da diversi riarrangiamenti genici, viene visualizzato come un rilievo a base molto larga senza la preminenza di un picco. Tutti i campioni sottoposti ad elettroforesi capillare sono stati interpretati con lettura indipendente da due membri del Dipartimento (lettura in doppio cieco).

4.7 Flusso di lavoro

Il flusso di lavoro seguito in questa prima parte della sperimentazione ha riguardato la validazione delle coppie di primer utilizzate nella diagnosi

molecolare dei linfomi B e la validazione della rilevazione di tali prodotti mediante elettroforesi capillare.

4.7.1 Validazione della PCR

Le prove necessarie per la validazione della PCR, sono state eseguite utilizzando i primer per i linfomi B precedentemente descritti, in tutte le combinazioni possibili (vedi Tabella 4).


Primer Forward		Primer Reverse
Gazza		CB2 modificato
Gufo		CB2
CB1		CB3
Tamura F		Tamura R

Tabella 4 Ogni primer Forward è stato utilizzato con ogni primer reverse

Ogni combinazione di primer è stata utilizzata in diverse concentrazioni (da 300 a 400 nM) e con diverse concentrazioni di Magnesio Cloruro (da 1.5 a 2.5 mM). Ogni reazione PCR, ha previsto uno dei due reagenti a concentrazione costante ed uno a concentrazione variabile.

Tali prove sono state eseguite su 5 campioni sani, 5 iperplastici e 5 linfomatosi ad immunofenotipo B noto. Dopo aver portato a termine le prove di concentrazione dei reagenti sono stati eseguiti dei gradienti sulla temperatura di *annealing* delle varie combinazioni di primer. Ogni temperatura è stata variata di +/-, 5° C rispetto alla temperatura calcolata dai software di analisi per l'efficienza dei primer (Beacon Designer Ver.7®)

L'ultima prova eseguita ha riguardato la diminuzione dei prodotti aspecifici (miglioramento della specificità) della reazione eseguendo una PCR Touch-Down, con una variazione di 0,5°C ogni ciclo di amplificazione da

una temperatura iniziale di 60°C ad una temperatura finale di 54°C, su tutte le coppie di primer.

Al termine delle prove di validazione sono state scelte le combinazioni di primer più efficaci nell'individuare la presenza di una popolazione clonale.

4.7.2 Validazione della rilevazione dei prodotti PCR con elettroforesi capillare

Dopo la selezione dei primer, sono state eseguite diverse analisi sul sequenziatore automatico. La prima prova ha previsto il caricamento dei prodotti PCR di 5 linfonodi sani, 5 linfonodi iperplastici e 5 linfomi ad immunofenotipo noto (B). I prodotti PCR di questa prima prova e i relativi prodotti amplificati di C μ , sono stati opportunamente diluiti e caricati singolarmente su sequenziatore, al fine di valutare le differenze esistenti tra i vari campioni (non-neoplastico VS neoplastico) e visualizzare i prodotti PCR di peso molecolare atteso (prova in *Singleplex*). Per rendere più uniforme questa prova sono stati utilizzati i prodotti derivati da campioni istologici il cui DNA era stato quantificato tramite spettrofotometro.

Le analisi successive hanno riguardato il caricamento dei prodotti PCR ottenuti dai campioni citologici linfomatosi, a gruppi di 20, ognuno in corsa *Singleplex* con il rispettivo prodotto C μ . Quest'ultimo prodotto è stato ritenuto di particolare importanza data la difficoltà di quantificare con tecniche tradizionali il DNA ottenuto dai campioni citologici: l'elettroforesi capillare permette infatti anche una valutazione quantitativa del prodotto, che nel caso del C μ , si riferisce alla quantità di DNA presente.

Dopo aver eseguito le prove in *Singleplex* di tutti i campioni biologici a disposizione, è stata tentata la validazione del caricamento in *Multiplex*, che si riferisce alla possibilità di analizzare con sequenziatore automatico, più prodotti PCR contemporaneamente, purché di peso molecolare diverso,

in modo tale da consentirne la visualizzazione. Per questa prova sono stati creati dei *pool* di PCR, addizionando insieme quantità determinate di ogni singolo amplificato e caricando successivamente su sequenziatore i *pool* così creati, insieme al marcatore molecolare.

Tali analisi hanno necessitato di diverse prove di diluizione al fine di ottenere la corretta visualizzazione di tutti i prodotti presenti nel *pool*.

4.7.3 Prova linfomi T

Tutti i campioni che non hanno mostrato la presenza di picchi monoclonali all'analisi di frammento per i linfomi B e alcuni campioni random positivi B (n=5), sono stati successivamente sottoposti a ricerca della clonalità T cellulare, effettuando le amplificazioni PCR per la ricerca della clonalità T, e rilevando successivamente tali prodotti tramite elettroforesi capillare.

Parte II: Prognosi molecolare di linfoma

4.8 Introduzione

Nella seconda parte di questo Capitolo verranno descritte le prove sperimentali eseguite per l'individuazione della Malattia Residua Minima in cani affetti da linfoma e sottoposti a trattamento antiblastico multifarmaco, con particolare riferimento alla scelta delle matrici ed alle tecniche molecolari utilizzate.

Anche questa seconda linea di ricerca è stata suddivisa in due parti, eseguite in due tempi diversi. Nella prima parte dello studio sperimentale (prova sperimentale 1), sono stati eseguiti prelievi bioptici linfonodali in 8 cani affetti da linfoma ad almeno un mese dall'ottenimento della remissione completa della sintomatologia, confrontandoli con quelli ottenuti in fase di ammissione; tali campioni sono stati successivamente sottoposti ad indagine molecolare tramite PCR al fine di individuare l'eventuale persistenza della popolazione clonale rilevata in ammissione, ed eventualmente correlare tali risultati con il decorso clinico di questi cani.

La seconda parte del lavoro, visti i risultati della prima parte è stata concentrata sul miglioramento della sensibilità delle tecniche molecolari a nostra disposizione al fine di individuare la presenza di una popolazione residua difficilmente dimostrabile con le tecniche PCR tradizionali (prova Sperimentale 2). A tal fine sono stati selezionati cani affetti da linfoma sottoposti a trattamento antiblastico, con follow-up clinico completo e matrici disponibili, sulle quali sono state eseguite le prove PCR, modificate per aumentarne la sensibilità; i prodotti così ottenuti sono stati visualizzati tramite elettroforesi capillare.

4.9 Matrici e criteri di inclusione

4.9.1 Prova Sperimentale 1

I campioni analizzati nella prima prova sperimentale sono stati ottenuti da 8 cani affetti da linfoma multicentrico successivamente trattati con protocollo chemioterapico multifarmaco della durata di 19 settimane che ha determinato la remissione completa dei sintomi in tutti i soggetti.

I campioni citologici in fase di ammissione sono stati ottenuti tramite AAS da linfonodi prescapolare e popliteo omolaterali da ogni paziente, ed utilizzati per effettuare la diagnosi di linfoma in tutti i casi di questa prova.

I campioni in fase di remissione completa sono stati ottenuti tramite Trucut 18G da linfonodi prescapolare e popliteo omolaterali, in tutti i soggetti dopo almeno un mese dall'ottenimento della remissione completa dei sintomi. I campioni biotici sono stati conservati in soluzione fisiologica e stoccati a -20° , fino all'esecuzione della sperimentazione.

4.9.2 Prova Sperimentale 2

La seconda prova sperimentale è stata eseguita dopo aver analizzato i risultati ottenuti dalla prima prova. Valutando l'estrema difficoltà ed l'invasività di effettuare diversi prelievi biotici linfonodali in soggetti in remissione completa della sintomatologia e considerando lo studio eseguito da Lana e collaboratori (2006), nel quale il 76% dei soggetti affetti da linfoma presentava concomitante positività PCR su sangue periferico, è stato deciso di utilizzare quest'ultima matrice al fine di individuare la Malattia Residua Minima. Pertanto, nell'ultimo anno sono stati stoccati tutti i prelievi ematici eseguiti per il monitoraggio ematologico di tutti i soggetti sottoposti a trattamento antitumorale. I campioni utilizzati in questa seconda parte del lavoro si riferiscono a prelievi eseguiti per il monitoraggio ematologico pre-trattamento, eseguiti sia in fase di induzione

chemioterapica che in fase di mantenimento. Le matrici così ottenute sono state numerate in ordine progressivo per ogni soggetto dall'ammissione fino alla recidiva.

I soggetti sono stati selezionati in base alla presenza di una clonalità B evidenziata allo studio eseguito in fase diagnostica, poiché la tecnica PCR utilizzata in questa parte della sperimentazione è stata messa a punto solamente per i linfomi a clonalità B. Un'ulteriore criterio di selezione ha riguardato la disponibilità di un follow-up clinico completo (dall'ammissione fino alla recidiva).

4.10 Estrazione del DNA

4.10.1 Prova Sperimentale 1

I campioni citologici in fase di ammissione ed i campioni bioptici in fase di remissione completa sono stati estratti con gli stessi protocolli utilizzati per i campioni in fase diagnostica (vedi paragrafo 4.4 di questo Capitolo).

4.10.2 Prova Sperimentale 2

I campioni ematici ottenuti durante il follow-up clinico dei soggetti trattati, sono stati raccolti in provette con anticoagulante (K₃EDTA) e successivamente sottoposti ad eritrolisi, con soluzione di lisi EL (Erythrocytes Lysis Buffer, DNA Blood mini kit Qiagen®) per l'isolamento del Buffy-coat; i pellettati così ottenuti sono stati stoccati a –20°C, fino all'esecuzione dell'estrazione del DNA con kit commerciale (DNA blood mini kit, Qiagen®).

4.11 PCR Prova sperimentale 1

Il DNA ottenuto dagli aspirati e dalle biopsie linfonodali in fase di ammissione e remissione completa è stato utilizzato per l'amplificazione dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene- specifici, utilizzando i primer ed il protocollo di amplificazione dello studio di Burnett e

collaboratori poichè al momento dello svolgimento di questa prima parte dello studio, era il solo lavoro presente in bibliografia veterinaria (vedi paragrafo 4.5 e Tabella 2 di questo Capitolo).

4.12 PCR Prova Sperimentale 2

Il DNA ottenuto dai campioni ematici, è stato utilizzato per la sperimentazione di una tecnica PCR (emi-nested) messa a punto dal nostro gruppo di ricerca, al fine di aumentare la sensibilità nell'identificazione di un clone neoplastico residuo all'interno di una più vasta popolazione linfocitaria policlonale normale.

4.12.1 Primer

Come già esposto nel paragrafo 4.5.2, i primer utilizzati in fase diagnostica sono costruiti su sequenze una interna all'altra, tutte in grado di amplificare la regione VDJ riarrangiata. La creazione di primer in grado di amplificare sequenze sufficientemente grandi, tali da poter fungere da stampo per una seconda PCR *inner*, è stato lo scopo del nostro lavoro. Tali primer denominati Gufo e Gazza, sono stati disegnati appositamente per garantire l'amplificazione di un prodotto su cui poter ulteriormente amplificare dei prodotti più piccoli come quelli messi a punto da Burnett e collaboratori (2003). Pertanto, i primer *forward* utilizzati nel primo round di PCR (*outer*), sono stati i due primer validati in fase diagnostica e denominati Gufo e Gazza, utilizzando un unico primer *reverse*, precedentemente riportato, denominato CB2 modificato.

La PCR *inner* (secondo round) è stata successivamente svolta utilizzando il primer *forward* validato da Burnett e collaboratori (2003) e denominato CB1, utilizzando lo stesso primer *reverse* del round *outer* (emi-nested PCR).

4.12.2 Validazione della PCR emi-nested

La PCR emi-nested da noi ideata è stata messa a punto utilizzando il sangue periferico di 5 soggetti sani, 5 iperplastici e 5 linfomi in fase di ammissione ed in fase di remissione completa dei sintomi. Come per le analisi effettuate in fase diagnostica, dapprima sono state eseguite prove di variazione di concentrazione dei reagenti (primer e del Magnesio) e successivamente, diversi gradienti della temperatura di *annealing*. Ogni reazione PCR, ha previsto uno dei due reagenti a concentrazione costante ed uno a concentrazione variabile. Ogni prova PCR è stata condotta utilizzando anche un bianco reagenti, considerando l'estrema sensibilità delle PCR nested a contaminazioni ambientali.

4.13 Visualizzazione dei risultati

4.13.1 Prova sperimentale 1

I prodotti di amplificazione della prima prova sono stati addizionati a Loading Dye e sottoposti a separazione elettroforetica su gel di poliacrilamide al 6% (Novex ® TBE Gels, Invitrogen). I risultati così ottenuti sono stati visualizzati con sistema computerizzato (Gel Doc 1000, Biorad®).

4.13.2 Prova Sperimentale 2

I prodotti di reazione ottenuti dopo PCR emi-nested, sono stati visualizzati random su gel di agarosio e successivamente sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico con le stesse modalità dei campioni in fase diagnostica.

Capitolo 5:

Risultati

Parte I: Diagnosi molecolare di linfoma

5.1 Premessa

In questo capitolo verranno riportati i risultati di tutte le prove sperimentali eseguite, in fase diagnostica (parte I) e prognostica (parte II).

5.2 Selezione dei casi

Dei 117 casi di linfoma canino registrati nel database delle patologie linfoproliferative del Dipartimento Clinico Veterinario dell' Università di Bologna, 107 soggetti sono stati inclusi sulla base dei criteri precedentemente esposti. Di questi, 17 casi sono risultati antecedenti all'anno 2000 (tra 1997 e 2000), pertanto la loro inclusione nel presente studio è stata basata sul solo referto citologico di linfoma. Dei rimanenti 90 soggetti, 33 avevano diagnosi istologica e citologica di linfoma, 67 diagnosi citologica di linfoma.

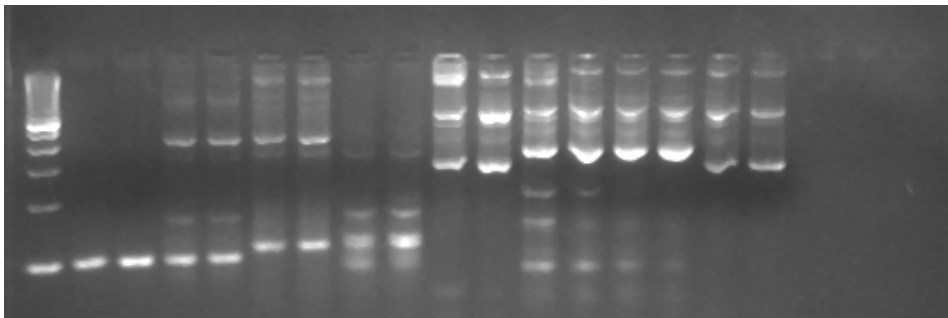
5.3 Controllo DNA

Dopo l'estrazione del DNA tutti i campioni sono stati sottoposti ad un controllo DNA costituito dalla PCR per l'amplificazione di C μ . I campioni negativi a C μ , sono risultati 11, di conseguenza, la sperimentazione è stata eseguita su 96 casi di linfoma canino costituiti da 77 preparati citologici linfonodali, 5 biopsie linfonodali, 4 aspirati intestinali, 2 epatici, 2 cutanei, 1 mediastinico 2 splenici, 2 aspirati midollari ed un' impronta da biopsia gastrica.

5.4 Risultati delle prove di validazione della PCR diagnostica: scelta dei primer

Le combinazioni di primer più efficienti nella identificazione della clonalità B sono risultati: Gazza/CB2 modificato; Gufo/CB2 modificato; Gazza/CB2; CB1/CB2; Tamura F/R, CB1/CB2 modificato. Sono state scelte 3 coppie di primer (Gufo/CB2 modificato CB1/CB2 modificato e Tamura F/R) con le quali sono state eseguite le PCR di tutti i campioni patologici e dei gruppi di controllo (sani e iperplastici) (vedi Figura 13). Un campione random dei prodotti di amplificazione è stato visualizzato su gel di agarosio contestualmente a controlli negativi eseguiti per tutte le miscele di reazione e rappresentati da una miscela di amplificazione in cui era aggiunta acqua invece di DNA..

Figura 13 Validazione PCR diagnostica con diverse coppie di primer, esempio di un linfoma. Linea 1 Marcatore molecolare, Linea 2-3: Tamura F/R, Linea 4-5 Tamura F/CB2; Linea 6-7 CB1/CB2 modificato; Linea 8-9 CB1/Tamura R; Linea 10-11 Gufo/CB2 modificato; Linea 12-13 Gazza CB2; Linea 14-15, Gazza/CB2 modificato; Linea 16-17, Gufo/CB2. I prodotti identici corsi su due linee si riferiscono al prodotto con due diverse temperature di annealing.

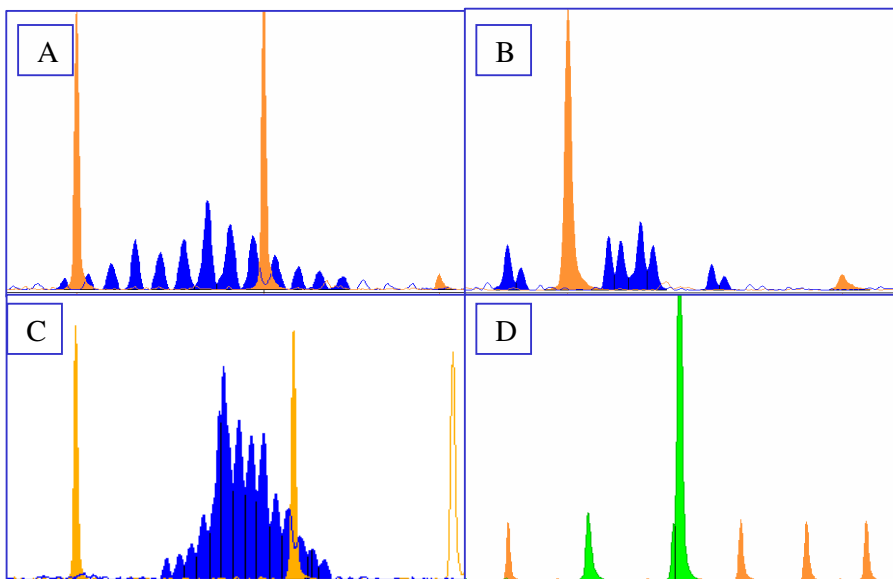


5.5 Analisi di frammento

5.5.1 Prova 5 sani/5iperplastici/5 linfomi

I risultati ottenuti dalla prima prova eseguita su sequenziatore automatico, hanno evidenziato la netta differenza di pattern esistente tra linfonodi sani, iperplastici e linfomatosi. I campioni dei cani affetti da linfoma hanno evidenziato la presenza di picchi isolati a base stretta, del peso molecolare atteso, mentre i campioni sani, hanno mostrato una serie di piccoli rilievi, a base larga, nessuno preminente rispetto agli altri (pattern policlonale). I campioni iperplastici hanno presentato più picchi di piccole dimensioni alcuni dei quali a base larga: nell'insieme l'aspetto visualizzato suggeriva un pattern di variabilità del riarrangiamento minore rispetto ai linfonodi sani, senza evidenza tuttavia, di picchi monoclonali (pattern oligoclonale). Alcuni risultati di questa prova sono riportati nella Figura 14.

Figura 14 Elettroforesi capillare in corsa *Singleplex* dei prodotti di un linfonodo sano (A,B,C,D) e iperplastico (E,F). A: prodotto TamuraF/R; B: prodotto CB1/CB2 modificato; C: prodotto Gufo/CB2 modificato; D: prodotto C μ . E: Gufo/CB2 modificato su linfonodo iperplastico; F: CB1/CB2 modificato su linfonodo iperplastico. In colore arancio è visualizzato il marcatore molecolare LIZ, in colore blu i prodotti (fluoroforo FAM), fatta eccezione per il quadrato D, dove il prodotto C μ è marcato con il fluoroforo verde HEX.



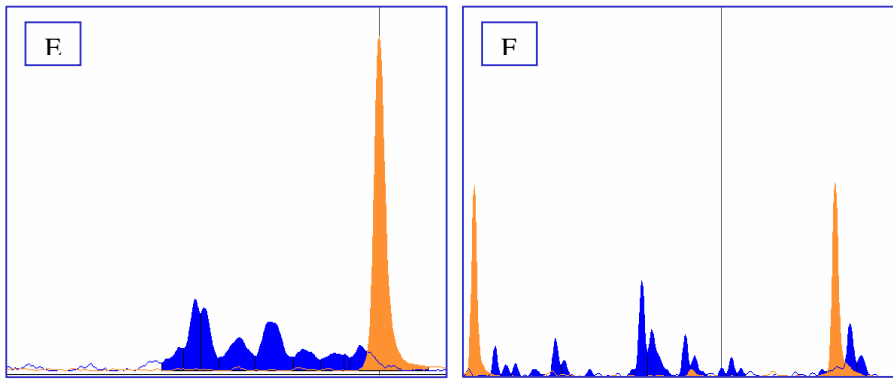
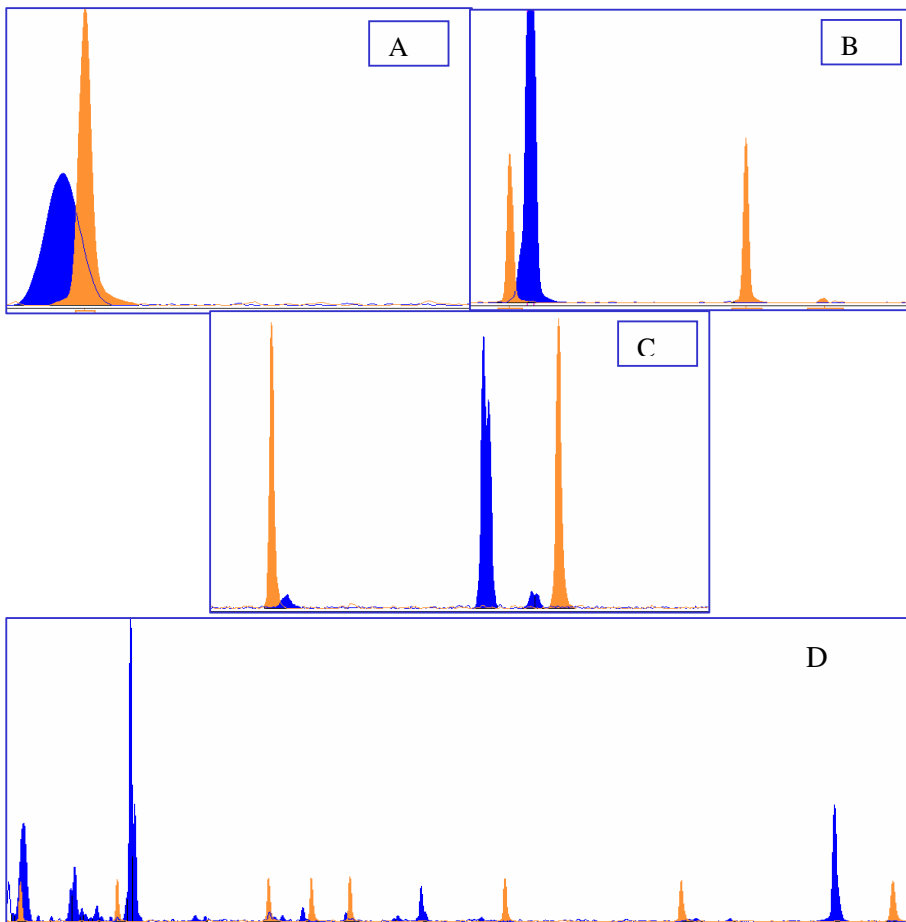


Figura 15 Pattern monoclonale, esempio di un linfoma B (ID 75), in corsa Singleplex (ID 75) e Multiplex (ID8). Corsa Singleplex: A (prodotto Tamura F/R), B (prodotto CB1/CB2 mod), C (prodotto Gufo/CB2 mod). Corsa in Multiplex (D): partendo da sx, i prodotti PCR sono: Tamura F/R; CB1/CB2 modificato; Gufo/CB2 modificato



5.5.2 Analisi di frammento dei 96 campioni patologici: ricerca della clonalità B

Nella Tabella 5 sono riportati i risultati con la relativa interpretazione dei 96 campioni ottenuti da cani affetti da linfoma sottoposti a PCR ed elettroforesi capillare per la ricerca della clonalità B.

La presenza di un picco monoclonale in almeno uno dei prodotti di clonalità B, è stato espresso come pattern monoclonale. I campioni negativi od oligoclonali al prodotto Gufo/CB2 modificato e positivi a CB1/CB2 modificato sono stati ulteriormente analizzati con la coppia di primer Gazza/CB2 modificato. I campioni negativi o policlonali a tutti i prodotti sono stati sottoposti alla ricerca della clonalità T. La mancata concordanza nell'interpretazione del pattern tra i due valutatori dell'analisi ha determinato la classificazione del campione come "policlonale", determinando la selezione di tali casi per la ricerca della clonalità T.

Tabella 4 Interpretazione dell'analisi di frammento per la ricerca della clonalità B nei 96 campioni oggetto di questo studio.

ID soggetto	Matrice	Gufo/CB2 modificato	CB1/CB2 modificato	Tamura F/R	Diagnosi
1	linfonodo	monoclonale	monoclonale	positivo	Monoclonale
2	linfonodo	monoclonale	monoclonale	positivo	Monoclonale
3	linfonodo	monoclonale	oligoclonale	positivo	Monoclonale
4	linfonodo	oligoclonale	monoclonale	positivo	Monoclonale
5	mediastino	monoclonale	monoclonale	positivo	Monoclonale
6	linfonodo	oligoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
7	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
8	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
9	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
10	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
11	linfonodo	oligoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
12	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
13	milza	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
14	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
15	linfonodo	ND	ND	ND	Escluso
16	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
17	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
18	linfonodo	monoclonale	oligoclonale	monoclonale	Monoclonale
19	intestino	oligoclonale	oligoclonale	oligoclonale	Policlonale
20	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
21	linfonodo	oligoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
22	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
23	intestino	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
24	linfonodo	monoclonale	oligoclonale	monoclonale	Monoclonale
25	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
26	linfonodo	policlonale	negativo	oligoclonale	Policlonale

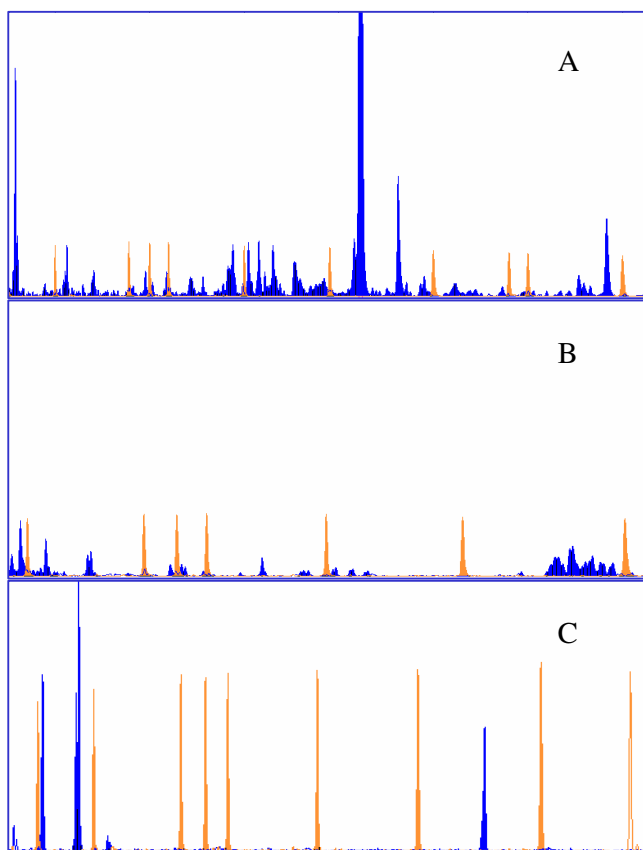
ID soggetto	Matrice	Gufo/CB2 modificato	CB1/CB2 modificato	Tamura F/R	Diagnosi
27	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
28	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
29	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
30	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
31	linfonodo	negativo	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
32	linfonodo	monoclonale	oligoclonale	monoclonale	Monoclonale
33	linfonodo	oligoclonale	oligoclonale	oligoclonale	Policlonale
34	stomaco	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
35	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
36	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
37	linfonodo	oligoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
38	cute	monoclonale	oligoclonale	oligoclonale	Monoclonale
39	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
40	intestino	oligoclonale	negativo	negativo	Policlonale
41	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
42	linfonodo	ND	ND	ND	Escluso
43	midollo	policlonale	negativo	negativo	Policlonale
44	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
45	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
46	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
47	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
48	linfonodo	oligoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
49	linfonodo	oligoclonale	oligoclonale	oligoclonale	Policlonale
50	linfonodo	policlonale	negativo	policlonale	Policlonale
51	milza	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
52	linfonodo	oligoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
53	linfonodo	negativo	monoclonale	monoclonale	Linfoma
54	linfonodo	policlonale	negativo	negativo	Policlonale
55	linfonodo	negativo	oligoclonale	oligoclonale	Policlonale

ID soggetto	Matrice	Gufo/CB2 modificato	CB1/CB2 modificato	Tamura F/R	Diagnosi
56	linfonodo	negativo	policlonale	policlonale	Policlonale
57	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
58	linfonodo	policlonale	negativo	negativo	Policlonale
59	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
60	linfonodo	negativo	policlonale	negativo	Policlonale
61	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
62	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
63	midollo	oligoclonale	oligoclonale	monoclonale	Monoclonale
64	cute	oligoclonale	negativo	negativo	Policlonale
65	midollo	monoclonale	negativo	monoclonale	Monoclonale
66	linfonodo	oligoclonale	negativo	oligoclonale	Policlonale
67	linfonodo	ND	ND	ND	Escluso
68	linfonodo	ND	ND	ND	Escluso
69	linfonodo	ND	ND	ND	Escluso
70	linfonodo	negativo	oligoclonale	oligoclonale	Policlonale
71	linfonodo	policlonale	oligoclonale	oligoclonale	Policlonale
72	linfonodo	policlonale	negativo	negativo	Policlonale
73	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
74	linfonodo	ND	ND	ND	Escluso
75	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
76	fegato	policlonale	negativo	negativo	Policlonale
77	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
78	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
79	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
80	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
81	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
82	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
83	linfonodo	policlonale	negativo	negativo	Policlonale
84	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale

ID soggetto	Matrice	Gufo/CB2 modificato	CB1/CB2 modificato	Tamura F/R	Diagnosi
85	intestino	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
86	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
87	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
88	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
89	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale
90	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
91	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
92	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
93	fegato	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
94	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
95	linfonodo	monoclonale	monoclonale	monoclonale	Monoclonale
96	linfonodo	policlonale	policlonale	policlonale	Policlonale

I tessuti non-linfonodali, hanno presentato *pattern* più irregolare con presenza, talvolta, di picchi di apparenza monoclonale, di grandezza intermedia ai prodotti attesi, particolarmente evidenti negli aspirati midollari. I risultati di questa ricerca hanno sancito la diagnosi di linfoma B in 55 soggetti. Sei campioni sono stati esclusi, per analisi di frammento negativa alla ricerca del picco C μ (quantità di DNA insufficiente). Un ulteriore campione (ID89), è stato escluso per impossibilità di eseguire le prove di clonalità T (campione insufficiente). I rimanenti 34 campioni sono stati processati per la ricerca della clonalità T.

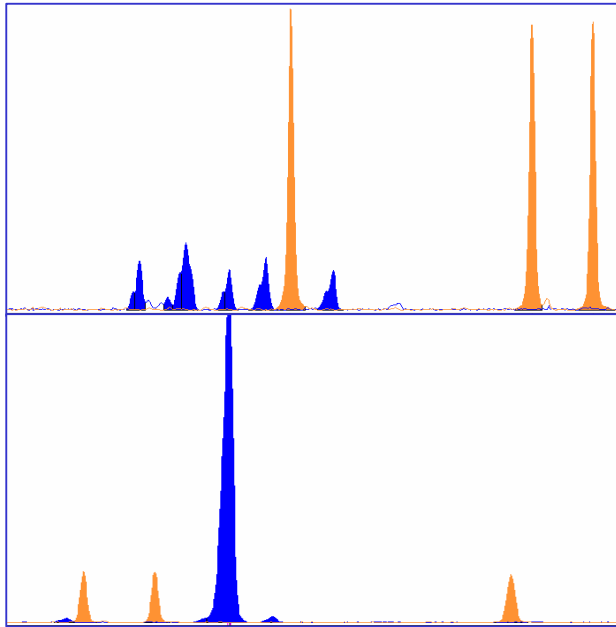
Figura 16 Linfoma in Multiplex, **A:** Pattern non-linfonodale (ID 63); **B:** pattern B policlonale (ID 96), **C:** pattern monoclonale (ID 86).



5.5.3 Ricerca della clonalità con primer Gazza/Cb2 modificato

Dei 55 campioni positivi (clonalità B), 9 campioni sono stati successivamente sottoposti alla PCR per il prodotto Gazza/CB2modificato, per la presenza di un prodotto Gufo/Cb2 modificato oligoclonale. Sette campioni sono risultati positivi a tale prodotto, contribuendo a confermare come l'utilizzo di diversi set di primer risulti indispensabile per la corretta valutazione della monoclonalità .

Figura 17 Esempio del prodotto Gufo/Cb2 modificato oligoclonale (ID6)(sopra) e ripetizione dello stesso campione con i primer Gazza/CB2 modificato (sotto).



5.5.4 Ricerca della clonalità T

La ricerca della clonalità T è stata eseguita in 34 campioni risultati policlonali alla linea B, e su 10 scelti in modo random tra quelli risultati monoclonali per la linea B. La scelta di utilizzare anche campioni a clonalità certa è stata dettata dalla oligoclonalità tipica del TCR, che spesso determina, la presenza di falsi positivi alla visualizzazione su gel di agarosio o poliacrilammide (Burnett et al, 2003, Avery e Avery, 2004). Tale ricerca è stata inoltre eseguita anche su cinque ulteriori campioni (ID1 e ID 29, 38, 48, 63). Nel primo caso, la visualizzazione su gel di agarosio eseguita nella prova di identificazione della Malattia Residua Minima, effettuata con i primer ottenuti da bibliografia (vedi risultati della seconda parte della sperimentazione) aveva evidenziato la presenza di una doppia clonalità (T e B); negli altri casi, la presenza di un pattern B di difficile

interpretazione (mancata concordanza diagnostica), o la concomitante presenza di ipercalcemia ha reso indispensabile l'esclusione della clonalità T cellulare.

I risultati della ricerca T, hanno evidenziato la presenza di un picco monoclonale in 30 soggetti. In due casi (ID1 e ID 48), la presenza di un riarrangiamento clonale in entrambi i loci (TCR e BCR) ha determinato la diagnosi di linfoma a doppia clonalità. I campioni monoclonali B scelti casualmente per l'analisi della clonalità T, sono risultati tutti negativi, così come negativi sono risultati gli altri campioni a pattern B di difficile interpretazione. I rimanenti 4 soggetti negativi alla ricerca della clonalità B e T cellulare sono stati considerati dubbi, per diagnosi di linfoma.

Figura 18 Esempio di prodotto TCR positivo (ID 51) (sopra) e negativo (ID 61) (sotto)

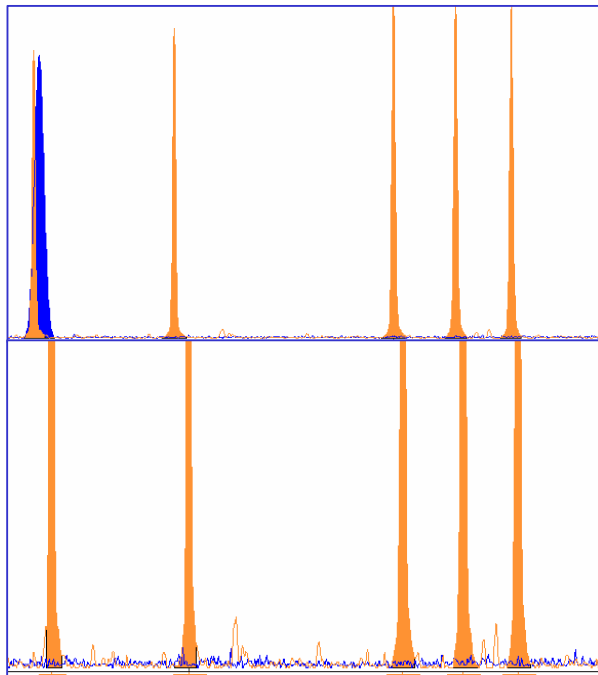


Tabella 5 Riassunto dei risultati ottenuti in fase di ammissione

Totale Casi	Clonalità B	Clonalità T	Pattern biclonale	Pattern non monoclonale	Esclusi
96	54	29	2	4	7

Parte II: Prognosi molecolare di linfoma

5.6 Prova Sperimentale 1: monitoraggio della malattia Residua Minima mediante biopsia linfonodale

Per i risultati di tale prova si inserisce di seguito il lavoro effettuato dal nostro gruppo di ricerca (*Veterinary Research Communications*, 30, 285-288, 2006). A integrazione del lavoro riportato si inserisce di seguito le immagini PCR analizzate tramite software di tutti i cani dello studio, con i risultati pre e post terapia (Vedi Figura 19). Si inserisce altresì descrizione estesa dei risultati ottenuti.

PCR Assessment of Minimal Residual Disease in 8 Lymphoma-Affected Dogs

C. Calzolari^{1,*}, F. Gentilini¹, C. Agnoli¹, A. Zannoni², A. Peli¹, S. Cinotti¹ and P. Famigli Bergamini¹

¹*Veterinary Clinical Department, Alma Mater Studiorum, University of Bologna 40064 Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy;* ²*Department of Veterinary Morphophysiology and Animal Production, Alma Mater Studiorum, University of Bologna 40064 Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy*

*Correspondence: E-mail: ccalzolari@vet.unibo.it

Calzolari, C., Gentilini, F., Agnoli, C., Zannoni, A., Peli, A., Cinotti, S. and Famigli Bergamini, P., 2006. PCR assessment of minimal residual disease in 8 lymphoma-affected dogs. *Veterinary Research Communications*, 30(Suppl. 1), 285-288

Keywords: dog, lymphoma, MRC, PCR

Abbreviations: BCR, B-cell receptor; FNA, fine needle aspiration; MRD, minimal residual disease; PCR, polymerase chain reaction; TCR, T-cell receptor

INTRODUCTION

In recent years, the evaluation of lymphoproliferative malignancies by molecular assays has become increasingly popular in human medicine. Since microscopic techniques are often unable to recognise a residual neoplastic population whenever it accounts for less than 1% of the total cells, molecular tools are mainly used for the assessment of the MRD (Campana and Pui, 1995; Rezuze *et al.*, 1997). Many different molecular markers have been evaluated in order to increase the sensitivity of the diagnostic tools; among these, the clonal rearrangements of immunoglobulin (VDJ segments) and TCR receptor (TRC γ V and J segments) genes, have been investigated.

A PCR assay for the identification of BCR and TCR clonal rearrangements has recently been validated in veterinary medicine; this assay was used in association with cytology and/or histology for diagnosing lymphoproliferative diseases in dogs (Burnett *et al.*, 2003; Dreitz *et al.*, 1999; Vernau and Moore, 1999).

The aim of this work was to evaluate the usefulness of this PCR assay in identification of MRD in lymphoma-affected dogs, in order to modulate therapeutic protocols to obtain longer remission times.

MATERIALS AND METHODS

PCR was performed on DNA extracted from lymph node samples collected from 8 lymphoma-affected dogs, referred to the Veterinary Clinical Department from April to

October 2004. In all cases, lymphoma was diagnosed by performing lymph node FNA; the cytological smears were subsequently used for the DNA extraction and the PCR amplification. The dogs underwent an antineoplastic multidrug therapy with an induction phase of 13 weeks; complete remission of symptoms was obtained for all patients.

Biopsy samples of the superficial lymph nodes were taken at the end of the induction phase from all patients. The 18G Tru-cut biopsies were only used for the DNA extractions. The DNA from cytological samples was obtained by scraping the stained smears, and extracted using a commercial kit (Qiap DNA micro kit, Qiagen). The same kit was used for DNA extraction from the biopsy samples.

The primers designed for the VDJ segments and the amplification protocol used were obtained from the literature (Burnett *et al.*, 2003). Two distinct targets (Ig H major and Ig H minor) were used for the evaluation of BCR; these targets were amplified in two distinct PCR reactions by one common primer and one specific-target primer.

The primers used for TCR clonal rearrangements detection were obtained from the same study as above (Burnett *et al.*, 2003). A DNA positive control, obtained from two primers directed to the exon 1 of the $C\mu$ gene segment coding for the constant region of BCR and TCR, was also performed for every sample.

The PCR products were revealed with Ethidium Bromide stain after polyacrilamide 6% gel electrophoresis (Novex 6% TBE gel, Invitrogen).

RESULTS

PCR assay was positive for all subjects at admission time. A clonal band on BCR was evident in 3 cases, one or 2 clonal bands on TCR were present in 2 subjects and finally, evidence of discrete bands on both TCR and BCR were observed in the remaining 3 samples (Figure 1A).

PCR assay was positive for 50% of samples collected in complete remission at the end of the induction phase of chemotherapy. Most of the post-therapy positive samples were characterized by evident clonal diversity and the appearance of new bands in comparison with admission time samples (Figure 1A). In contrast with the admission time samples, the majority of PCR positive samples during remission were TCR clonal rearrangements.

At the moment of writing this report, among the 3 relapsed dogs, 2 have had a positive PCR post-therapy and 1 negative. A further subject with post-therapy negative PCR, is still in complete remission of symptoms 11 months after the beginning of therapy.

DISCUSSION

MRD is characterized by the persistence of a neoplastic clone interspersed in a prevailing population of normal lymphoid cells. The consensus primers used in this work, are directed to gene sequences belonging to both normal and neoplastic lymphocytes; thus primers compete at the same target DNA site in either normal or neoplastic cells, lowering the sensitivity of the assay for detecting a residual population of neoplastic cells in post-therapy samples. One of the strategies used in human medicine to avoid this pitfall and increase the

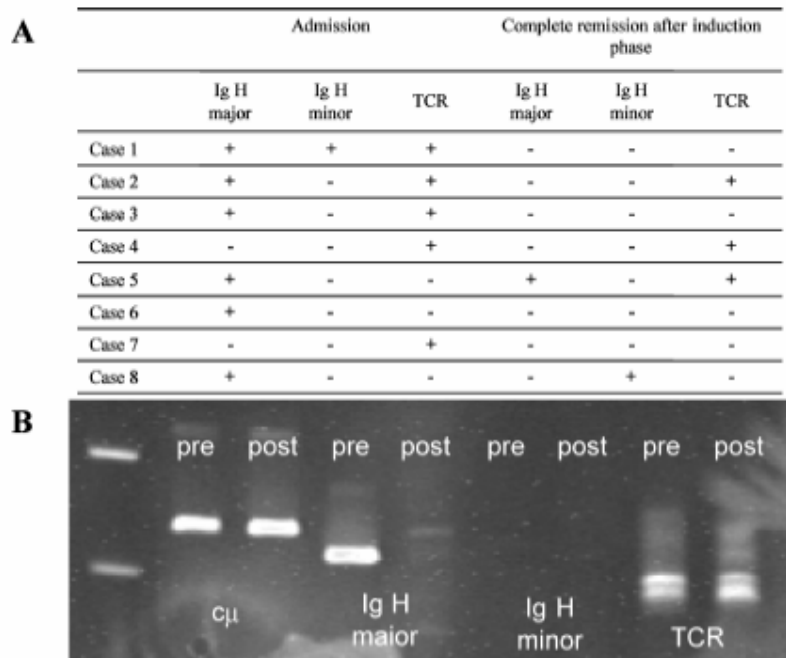


Figure 1. A – Pre-therapy and post-therapy positive PCR samples of 8 lymphoma-affected dogs; B – Example of PCR assay (Case No. 2). *Lane 1*: 100 bp molecular weight marker, *lanes 2–3*: C μ DNA control, *lanes 4–9*: PCR results pre and post chemotherapy induction protocol. BCR, B-Cell Receptor; TCR, T-Cell Receptor. Ig H major and Ig H minor are targets of BCR gene

sensitivity of the test is to design patient-specific primers, obtained by sequencing the clone that was identified at admission time for each patient. In this case it is possible to accurately predict the possible recovery of the patient. On the contrary, the negative results obtained with the consensus primer PCR assay has a low prediction value for recovery.

The aim of this study was to evaluate the sensitivity of the PCR assay with consensus primers for identification of a residual neoplastic clone of lymphoid cells. In veterinary medicine virtually all lymphoma-affected dogs relapse; in this context, our hypothesis was that negative PCR assays during remission could predict longer remission times. However, the lack of direct microscopic evaluation of bioptic post-therapy samples does not allow us to ascertain whether the post-therapy negative results were affected by the complete absence of lymphoid cells in the samples. The presence of a sudden relapse in a PCR negative subject proves that this could have occurred. Thus, it would be very useful to introduce the direct microscopic evaluation of samples into the experimental protocol for preliminary evaluation of the adequacy of samples.

The presence of either B or T clonal rearrangements at admission time are in agreement with other studies (Burnett *et al.*, 2003). However, it is interesting to note the disappearance of the BCR bands, and the persistence of TCR clonality, in the post-therapy samples. This could be cautiously interpreted as evidence for greater chemoresistance of T clones, already present at admission time or appearing during the course of the pathology or, finally, selected by antineoplastic therapy.

We conclude that modification of the experimental protocol as suggested above and completion of the clinical follow-up of reported cases could eventually clarify, the real utility of this assay in the clinical management of lymphoma-affected dogs.

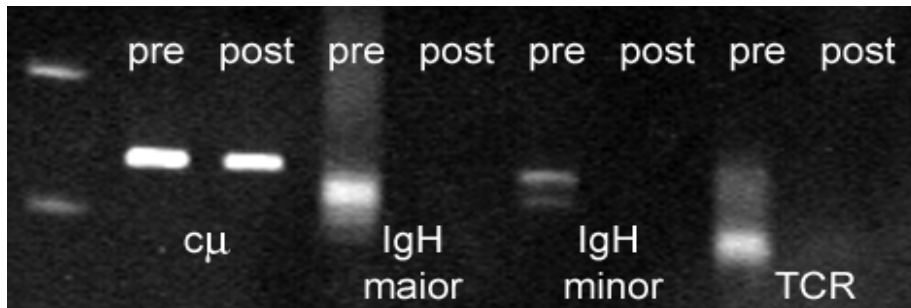
REFERENCES

- Burnett, R.C., Vernau, W., Modiano, J.F., Olver, C.S., Moore, P.F. and Avery, A.C., 2003. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Veterinary Pathology*, 40, 32–41
- Campana, D. and Pui, H.C., 1995. Detection of minimal residual disease in acute leukaemia: methodological advances and clinical significance. *Blood*, 85, 1416–1434
- Dreitz, M.J., Ogilvie, G. and Sim, G.K., 1999. Rearranged T lymphocyte antigen receptor genes as marker of malignant T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69, 113–119
- Rezuke, W.N., Abernathy, E.C. and Tsongalis, G.J., 1997. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clinical Chemistry*, 43, 1814–1823
- Vernau, W. and Moore, P.F., 1999. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69, 145–164

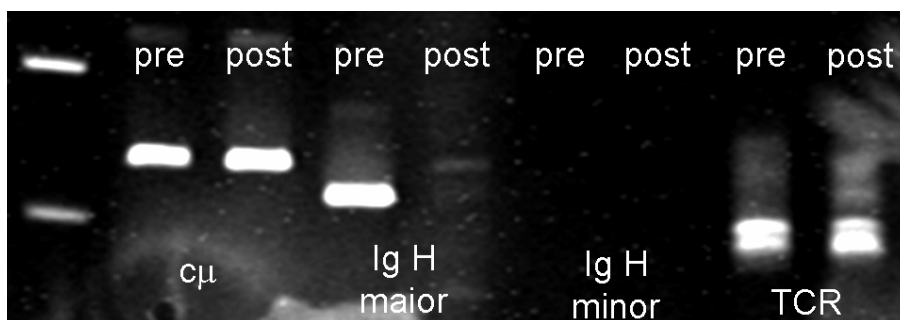
Figura

19. Analisi PCR degli 8 casi di linfoma. Nella corsia di sx è rappresentato il marker molecolare 100 e 200 bp. A seguire (da sx a dx) sono rappresentati, il controllo positivo $C\mu$, pre e post terapia (corsia 2 e 3), IgH maior e minor pre e post terapia (da corsia 4 a 7), TCR pre e post terapia (corsia 8 e 9).

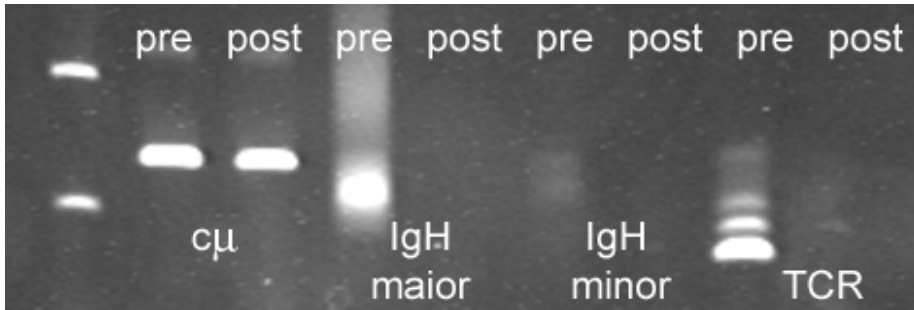
Caso N°1



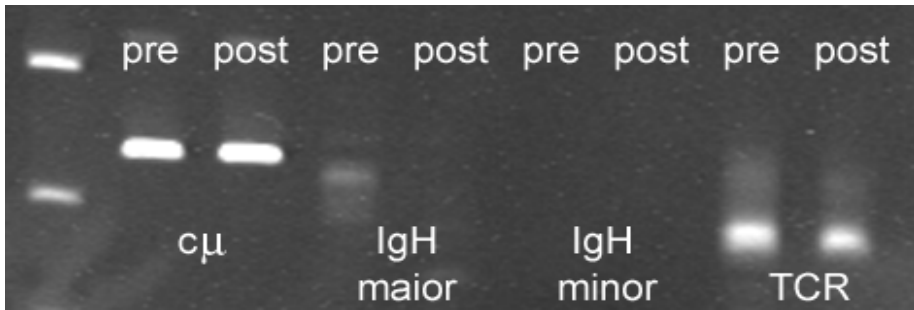
Caso N°2



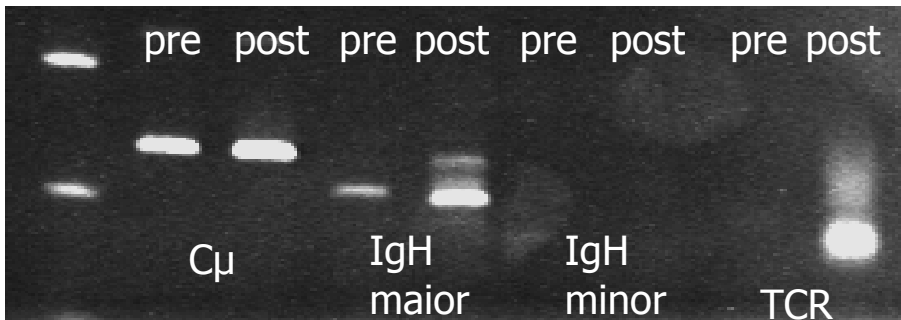
Caso N°3



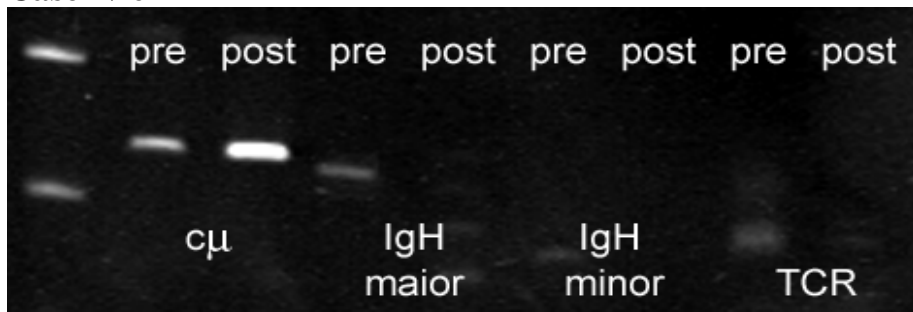
Caso N°4



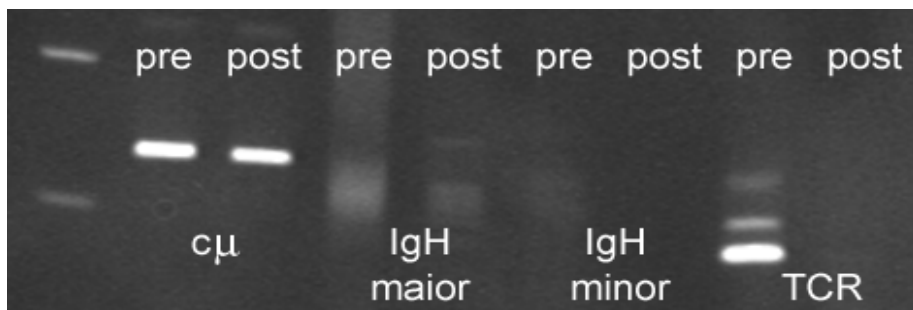
Caso N°5



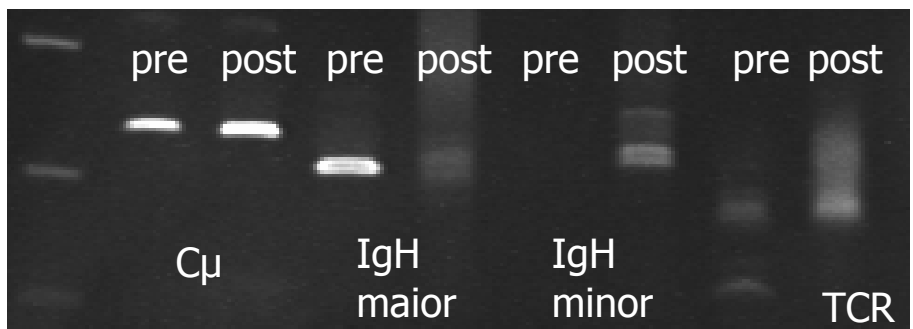
Caso N°6



Caso N°7



Caso N°8



Tutti i campioni prelevati dai soggetti in ammissione sono risultati positivi al test PCR. Tre soggetti hanno mostrato la presenza di un riarrangiamento clonale di IgH maior (Caso 5, 6 e 8), 2 casi, la presenza di un riarrangiamento clonale del TCR. Nei restanti casi (1, 2, 3) si sono evidenziati riarrangiamenti genici clonali di entrambi i tipi di recettori antigene-specifici (IgH e TCR).

Il 50% dei campioni ottenuti in remissione completa post-terapia hanno mostrato positività all'analisi PCR. A differenza dei risultati all'ammissione, la maggioranza della positività post-terapia è stata ascritta a riarrangiamenti genici clonali del TCR; dei 4 casi risultati positivi, 3 hanno infatti presentato bande clonali a carico del TCR. Soltanto il Caso n° 8 ha mantenuto la sola positività B nell'ammissione e nella remissione post-terapia; tutti gli altri soggetti positivi B all'ammissione sono risultati negativi in remissione completa (Casi 1, 3 e 6), ad eccezione del Caso n°5, risultato positivo ad un riarrangiamento clonale del TCR, non presente in ammissione.

Dei 4 soggetti che hanno mostrato PCR negativa nella fase di remissione completa post-terapia (Casi n° 1,3,6,7), due hanno presentato una recidiva precoce; il Caso n°7 ha presentato una recidiva prima del termine della fase di induzione chemioterapica, il Caso n°1, dopo un mese dal termine della stessa. I rimanenti 2 soggetti (Caso 3 e 6), hanno mostrato DFI rispettivamente di 333 gg e 692 gg. I due soggetti che presentavano ipercalcemia in ammissione (Caso 3 e 7), sono risultati negativi alla prova PCR eseguita in remissione dei sintomi.

Dei 4 soggetti risultati positivi alla PCR post-terapia (Casi n° 2,4,5,8), il soggetto N°2, ha presentato, persistenza della positività del TCR, e negatività post-terapia del riarrangiamento clonale di IgH. Tale paziente permane tutt'ora in remissione clinica dei sintomi. Il Caso N°4, positivo pre e post terapia a riarrangiamento clonale del TCR, è deceduto in remissione completa dei sintomi per cause non correlate alla neoplasia. Il Caso N° 5, risultato positivo a riarrangiamento clonale i IgH pre e post terapia e positivo a riarrangiamento in TCR in fase di remissione completa, ha mostrato recidiva precoce, prima del termine del trattamento di induzione. Il Caso N°8, è risultato positivo a riarrangiamento clonale in IgH

maior all'ammissione, e positivo per riarrangiamento clonale su IgH minor, in fase di remissione. Tale paziente ha mostrato un DFI di 210 gg, seguito da recidiva e seconda remissione dei sintomi della durata di 127 gg.

5.7 Monitoraggio della Malattia Residua Minima mediante PCR emi-nested

5.7.1 Selezione dei casi

I cani sottoposti a trattamento chemioterapico per i quali erano disponibili campioni di sangue periferico, sono stati 7. Di questi, 3 hanno mostrato clonalità T e 4 clonalità B all'analisi di frammento.

Al momento della stesura di questa tesi, dei quattro soggetti con linfoma B, uno è tutt'ora in remissione completa della sintomatologia, un ulteriore paziente è deceduto per cause non correlate alla progressione della neoplasia, ancora in remissione clinica della sintomatologia. I restanti due soggetti sono stati sottoposti a PCR emi-nested per la ricerca del clone neoplastico residuo. Tali soggetti sono denominati Caso N°1 e caso N°2.

5.7.2 Follow-up clinico e matrici

Il Caso N°1, ha ottenuto una remissione completa della sintomatologia 2 settimane dopo l'inizio della terapia antitumorale per poi mostrare una recidiva precoce 3 mesi e mezzo dopo l'inizio del trattamento. Pertanto i campioni ematici selezionati per la PCR emi-nested sono stati 4: il primo a due settimane dall'ottenimento della remissione completa, gli altri 3, a distanza di un mese l'uno dall'altro fino alla recidiva.

Il Caso N°2, ha ottenuto la remissione completa della sintomatologia 1 settimana dopo l'inizio del trattamento antitumorale, per poi mostrare un lungo intervallo libero da malattia (DFI = 380 gg). I campioni selezionati per la PCR emi-nested, sono stati 9: il primo ottenuto al termine della fase

di induzione chemioterapica, i prelievi successivi, a distanza di un mese l'uno dall'altro, fino alla recidiva.

Tutti i campioni sono stati numerati in ordine progressivo, secondo il follow-up clinico: dalla remissione alla recidiva.

5.7.3 Validazione della PCR emi-nested visualizzata con elettroforesi capillare

La visualizzazione dei prodotti ottenuti tramite PCR emi-nested di 5 campioni sani, 5 iperplastici e 5 linfomi in ammissione hanno evidenziato la differenza esistente tra i campioni neoplastici e non neoplastici (Vedi Figura 20).

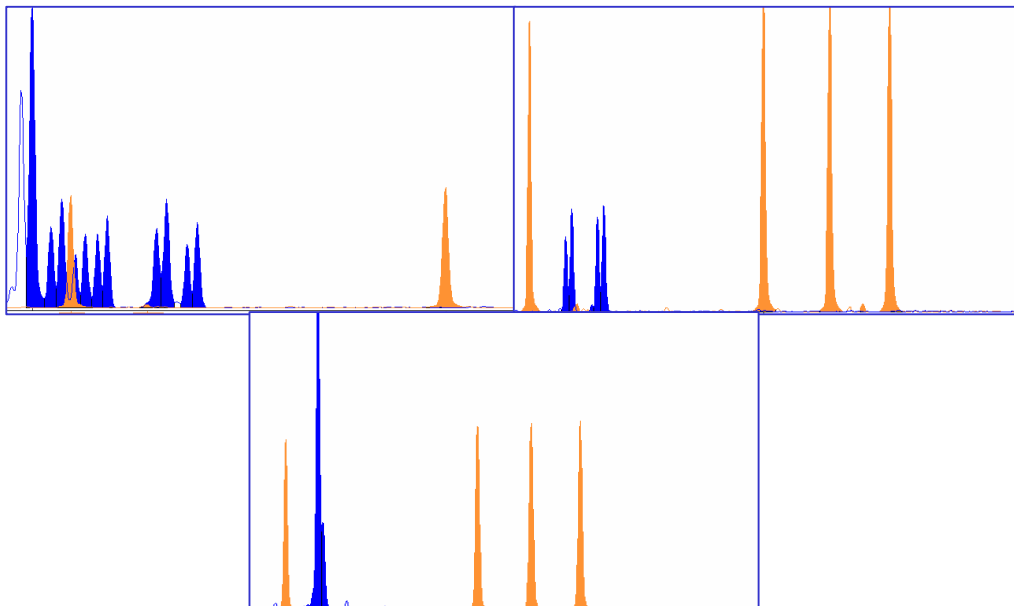
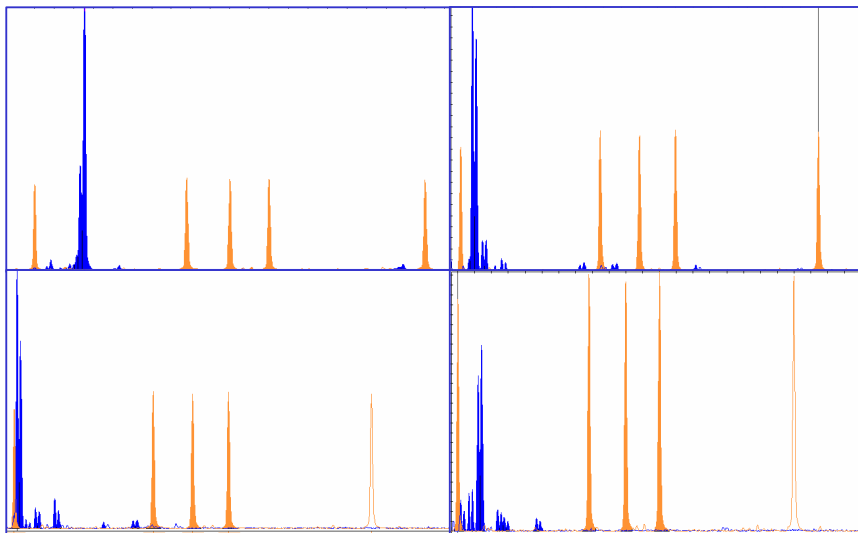


Figura 20 Prodotti ottenuti tramite PCR emi-nested su campioni di sangue periferico di un soggetto sano (in alto a sx), iperplastico (in alto a dx) e affetto da linfoma (in basso).

5.7.2 Decorso Caso N°1

I campioni sottoposti ad indagine molecolare per la ricerca della Malattia Residua Minima nel Caso N°1 hanno evidenziato la presenza di un prodotto clonale in tutti e quattro i prelievi eseguiti sul cane (vedi Figura 21).

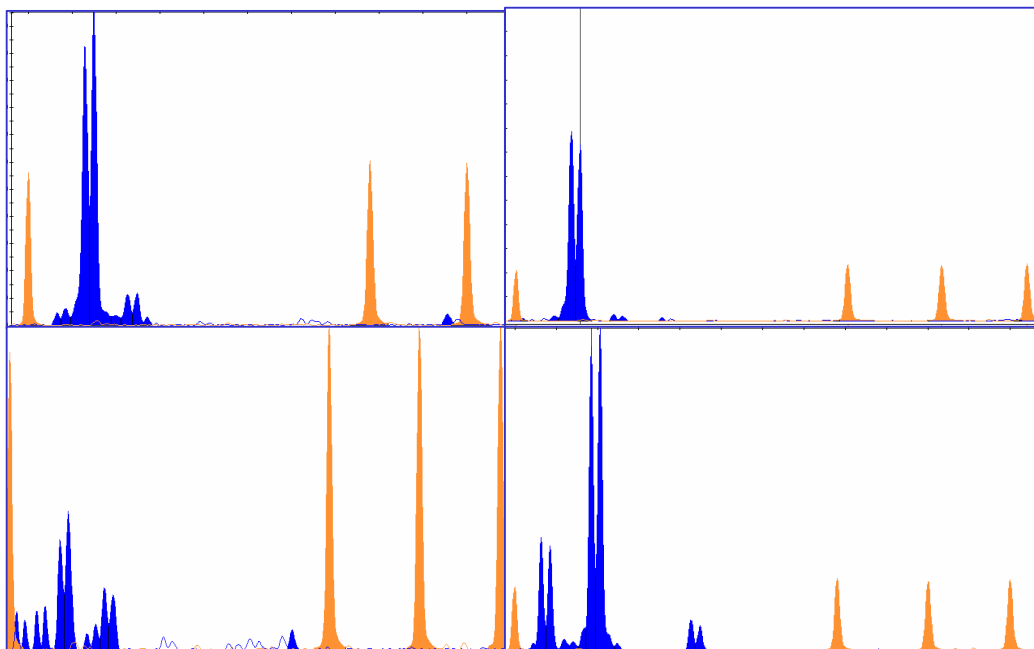
Figura 21 Risultati del monitoraggio della MRM nei quattro prelievi riferiti al Caso N°1. Tutti i campioni sono stati ottenuti con il soggetto in remissione clinica ad eccezione dell'ultimo, che si riferisce alla recidiva clinica. I campioni sono disposti da sx a dx e dall'alto verso il basso, in ordine orario.



5.7.3 Decorso Caso N° 2

Il monitoraggio della Malattia Residua Minima del soggetto N°2, è riportato in Figura 22.

Figura 22 Andamento molecolare della Malattia Residua Minima nel soggetto N°2. Nella figura sono riportati il prelievo N°4, N°7-8-9, disposti in senso orario da sx a dx. I primi tre prelievi sono sostanzialmente identici al prelievo 4. Progredendo dal 4° al 7° prelievo (2 mesi prima della recidiva clinica), si assiste ad una diminuzione progressiva dell'altezza del picco fino all'8° prelievo (1 mese prima della recidiva clinica) dove si verifica un aumento dell'altezza del picco che permane fino alla recidiva (9° prelievo).



Capitolo 6:

Discussione e Conclusioni

6.1 Diagnosi molecolare di linfoma

Negli ultimi anni, i test molecolari per la ricerca della clonalità, sono diventati sempre più importanti nel protocollo diagnostico delle neoplasie linfoproliferative, anche in Medicina Veterinaria.

E' indispensabile tuttavia precisare che il rilevamento di una popolazione cellulare monoclonale, non implica necessariamente una diagnosi di neoplasia. E' altresì indubbio che una neoplasia sia costituita da una popolazione cellulare clonale; per questo motivo, i test per la ricerca della clonalità pur non essendo in grado singolarmente di determinare la diagnosi di linfoma vengono frequentemente utilizzati in un contesto clinico e laboratoristico più ampio, costituendo un importante corollario al protocollo diagnostico delle neoplasie linfoproliferative. L'importanza clinica di tali test è indubbia, soprattutto in relazione alla possibilità di utilizzare la clonalità come target molecolare per il monitoraggio della malattia residua minima.

Nel presente studio, la diagnosi di linfoma è stata effettuata con i metodi tradizionali (indagini cito/istologiche), pertanto il nostro scopo non è stato quello di emettere o confermare diagnosi di linfoma quanto quello di cercare di aumentare la sensibilità e la specificità della diagnosi di clonalità attraverso l'analisi di frammento eseguita su un'ampia popolazione di cani affetti da questa patologia. Inoltre sono state selezionate più coppie di primer (due delle quali create dal nostro gruppo di ricerca) per cercare di incrementare ulteriormente la sensibilità e permettere al contempo la

validazione di prodotti creati per essere utilizzati nel monitoraggio della malattia residua minima. Dai risultati ottenuti in fase diagnostica emerge come ogni coppia di primer non sia in grado singolarmente di individuare una popolazione monoclonale in tutti i campioni sottoposti ad indagine PCR; tuttavia, combinando insieme tre coppie di primer in grado di amplificare sequenze geniche una interna all'altra siamo stati in grado di rilevare la presenza di una popolazione linfoide monoclonale in 85 campioni testati su 89. A conferma di tale evidenza, i campioni risultati oligoclonali (n=9) con la coppia di primer Gufo/CB2 modificato sono stati analizzati con una seconda coppia (Gazza/CB2 modificato), disegnata sullo stesso segmento e sulla stessa regione genica, determinando un prodotto clonale in sei campioni. Questi risultati possono confermare come anche nei linfomi canini l'utilizzo di diversi set di primer, possibilmente disegnati per l'individuazione di famiglie di segmenti genici V, possa ridurre i risultati falsi negativi. In Medicina Veterinaria non sono riportate, a nostra conoscenza suddivisioni in sottofamiglie per omologia di sequenza dei segmenti genici V; gli studi eseguiti da Tutter e Riblet (1989) suggeriscono una omologia esistente tra segmenti genici V canini e la famiglia VH3 umana, sebbene si possa azzardare per similitudine con la controparte umana che anche i segmenti genici V canini possano essere suddivisibili in base al grado di omologia.

A questo proposito in Medicina Umana la standardizzazione delle metodiche PCR per la diagnosi di linfoma, ha previsto l'utilizzo di 7 primer forward ognuno disegnato su una delle sette famiglie di segmenti V, combinati ad un unico primer consenso reverse J (van Dongen, 2003).

La decisione di creare due ulteriori primer *forward* per la linea cellulare B è stata dettata dalla necessità di ottenere un prodotto molecolare sufficientemente grande da poter analizzare tramite una PCR emi-nested,

volta ad aumentare la sensibilità delle tecniche tradizionali nell'individuazione della malattia residua minima.

Tuttavia, un prodotto di peso molecolare elevato è più soggetto a degradazione del DNA in frammenti più piccoli, soprattutto se i campioni vengono conservati per lungo tempo a temperatura ambiente come alcuni strisci citologici da noi utilizzati in questo studio retrospettivo. Tutti i campioni che hanno dato esito negativo per la ricerca di Gufo/CB2 modificato provengono da campioni stoccati da oltre 8 anni (1997-2000).

La scelta di effettuare l'analisi di frammento è stata dettata dagli enormi vantaggi che offre rispetto alla visualizzazione dei prodotti PCR su gel, per i limiti interpretativi che quest'ultima tecnica di visualizzazione pone (oligoclonalità/ false clonalità). L'elettroforesi capillare è un'analisi caratterizzata da una grandissima precisione che permette di rilevare differenze di grandezza tra prodotti dell'ordine di 1 nucleotide, consentendo di stabilire con estrema accuratezza la presenza di una popolazione clonale.

L'elettroforesi capillare consente inoltre di visualizzare prodotti PCR altrimenti non visibili, come quelli ottenuti in fase di remissione completa della sintomatologia, contenenti un clone neoplastico residuo in una popolazione predominante costituita da cellule linfocitarie normali, aumentando così la capacità di individuazione della malattia residua minima (Jilani et al, 2006).

L'analisi di frammento ha tuttavia diversi limiti soprattutto legati al costo della strumentazione e della manutenzione del sequenziatore, sebbene il costo della singola analisi risulti piuttosto contenuto.

Un secondo limite di questa tecnica è rappresentato dalle difficoltà di validazione: la visualizzazione dipende molto dalla quantità e dal tipo di amplificato utilizzato. Gli artefatti da "plusA" o gli eccessi di amplificato

hanno senz'altro rappresentato alcuni dei problemi più frequenti da noi riscontrati.

La validazione della PCR multiplex ha rappresentato la parte più difficile del presente lavoro. I vantaggi di poter visualizzare più prodotti PCR contemporaneamente è ovvio, così come ovvio è il contenimento dei costi di esecuzione effettuando una singola corsa elettroforetica per campione. Tuttavia, la quantità e la grandezza di ogni singolo amplificato hanno determinato notevoli problemi nella corretta visualizzazione di tutti i prodotti ed hanno necessitato di molteplici prove eseguite utilizzando diluizioni reciproche diverse in dipendenza della grandezza e della quantità del prodotto.

Le analisi eseguite con sequenziatore genetico, hanno determinato la possibilità di evidenziare prodotti che la visualizzazione effettuata su gel di poliacrilammide non ha permesso di discriminare. Per esempio in alcuni casi, all'interno di una banda discreta definita come monoclonale alla visualizzazione su gel, è stato possibile individuare due o tre prodotti monoclonali molto simili per grandezza, permettendo di avanzare alcune ipotesi patogenetiche. Una possibile spiegazione potrebbe essere dovuta al meccanismo di diversità giunzionale che si verifica sulla regione CDR3 ad opera delle ricombinasi, per apposizione di qualche nucleotide extra alle estremità codificanti dei segmenti genici, durante il processo di ricombinazione. Un ulteriore esempio può essere rappresentato dalla identificazione di due picchi posti alla distanza di circa 10 paia di basi, non discriminabili alla visualizzazione su gel ed evidenziati frequentemente all'analisi di frammento. Tali doppi picchi potrebbero essere determinati dal fenomeno di mancata esclusione allelica per il quale la presenza di entrambi gli alleli riarrangiati potrebbe spiegare un doppio picco, presente su tutti i prodotti PCR di un campione.

L'interpretazione dell'analisi di frammento eseguita complessivamente sui 96 casi di questo lavoro ha evidenziato la presenza di pattern di semplice interpretazione (pattern monoclonali e policlonali) esattamente sovrapponibili a quelli studiati in Medicina Umana (van Dongen et al, 2003), e pattern più complessi, come quelli riscontrati soprattutto su matrici non linfonodali o su tessuti linfonodali molto vecchi nei quali la degradazione del DNA ha determinato dei pattern a smear, accanto ai picchi di peso atteso. Nel caso di matrici non-linfonodali sono stati visualizzati pattern caratterizzati da molteplici picchi non specifici (soprattutto attorno ai 200bp, anche di notevoli dimensioni) associati a prodotti attesi dall'apparenza clonale, ma caratterizzati da base leggermente più ampia o irregolare. Una possibile spiegazione, potrebbe essere rappresentata dalla quantità di "background" linfocitario policlonale, più probabilmente presente in tessuti non linfonodali quali cute, intestino o midollo. La presenza di background policlonale è annoverata tra le cause di risultati falsi negativi per la competizione esercitata da queste cellule sui primer consenso (van Dongen et al, 2003) La presenza di una concomitante popolazione policlonale potrebbe spiegare la grande quantità di aspecifici presenti, anche se in alcuni casi, la forma di tali prodotti è risultata decisamente clonale, suggerendo, come riportato in medicina umana, la possibilità di prodotti di riarrangiamento intermedi rispetto alle dimensioni di quelli attesi, dovuti probabilmente all'attacco dei primer a sequenze omologhe, interne od esterne a quelle su cui stati sono disegnati (annealing aspecifico), oppure all'amplificazione di un frammento derivante da una linea germinale (non riarrangiato) (van Dongen et al, 2003).

Eseguendo le analisi di frammento in corsa *singleplex* è stato possibile individuare anche prodotti clonali di grandezza maggiore rispetto a quello atteso. Secondo van Dongen e collaboratori (2003) questi prodotti

potrebbero essere dovuti ad annealing del primer reverse (posto sul segmento genico J), al segmento genico J più vicino a quello riarrangiato. La regione J con i suoi 6 segmenti occupa infatti una regione molto piccola, che consentirebbe l'attacco e l'amplificazione di un prodotto anche sui segmenti J non riarrangiati. Tuttavia l'unico studio eseguito sull'organizzazione genica del locus H in Medicina Veterinaria (Tamura et al, 2006), ha identificato un solo segmento genico J, che pertanto non supporterebbe tale spiegazione. Si potrebbe ipotizzare che l'annealing sul segmento non riarrangiato possa avvenire da parte del primer forward, posto sul segmento V che potrebbe attaccarsi al segmento più vicino non riarrangiato. In effetti l'ampiezza della regione V, con i segmenti separati da lunghe sequenze introniche non dovrebbe permettere l'amplificazione di un prodotto PCR, tuttavia il riarrangiamento VDJ non implica necessariamente l'impossibilità dei primer di legarsi ad un segmento V posto sufficientemente vicino al suo omologo riarrangiato.

In generale la difficoltà di interpretazione, dipende senz'altro dalla quantità di clone neoplastico presente. Pattern irregolari o a smear o ancora prodotti aspecifici possono non creare problemi se il prodotto molecolare del peso atteso, determina un picco di altezza rilevante. Tuttavia uno dei limiti di questa metodica è l'elaborazione da parte del software delle altezze relative dei picchi rispetto allo standard di riferimento, la cui altezza non è sempre costante ma può oscillare all'interno di un range prestabilito dalla ditta costruttrice (tra 900 e 1200 CFU) ed è in dipendenza dalla quantità di marcatore presente per ogni campione. Pertanto individuare una popolazione clonale in di un pattern di questo tipo può risultare molto difficile.

6.2 Prognosi molecolare di linfoma

Il primo esperimento condotto allo scopo di identificare la malattia residua minima in cani affetti da linfoma ha evidenziato le difficoltà di standardizzazione di prelievi bioptici linfonodali in cani in remissione clinica della sintomatologia, sottolineando al contempo come la clonalità T fosse quella più rappresentata nei campioni post-terapia, probabilmente per la presenza di una popolazione oligoclonale T reattiva non distinguibile da una popolazione monoclonale (false positività T). I campioni risultati negativi non sono stati peraltro confermati da indagine istologica concomitante determinando perciò la possibilità di falsi negativi per inadeguatezza del campione.

La scelta di effettuare la ricerca della malattia residua minima da sangue periferico è stata dettata sia dalla necessità di standardizzare le tecniche di prelievo rendendole più semplici e meno invasive, sia dalla necessità di standardizzare l'estrazione del DNA, consentendo di sottoporre ad indagini molecolari quantità paragonabili di DNA di uno stesso soggetto.

Il lavoro di Keller e collaboratori (2004), ha evidenziato come la positività alla ricerca della clonalità su sangue periferico sia evidente in un numero molto elevato di cani affetti da linfoma. Purtroppo, i soggetti eligibili per la prova sperimentale sono stati soltanto 2 (ID 8 e ID86); pertanto, i risultati di queste prove possono far avanzare ipotesi interpretative, che devono comunque essere analizzate e comprovate da un ampio studio casistico.

La scelta della tecnica da utilizzare (PCR emi-nested), è stata dettata dall'evidenza che la PCR tradizionale non è in grado di discriminare la persistenza di un clone neoplastico residuo all'interno di una popolazione linfocitaria policlonale predominante, producendo degli smear pattern (competizione dei primer). Per questo motivo sono stati creati e validati in fase diagnostica 2 primer forward, combinati con un primer reverse J

modificato, in grado di determinare un amplificato di peso molecolare sufficiente per essere utilizzato come stampo in una seconda reazione PCR, aumentando la sensibilità di rilevamento del clone. La necessità di modificare il primer J è nata dalla difficoltà pratica di utilizzare i due primer reverse (CB2 e CB3) descritti da Burnett e collaboratori (2003), che non possono essere miscelati in un'unica reazione PCR, aumentando i tempi di esecuzione. Il primer CB2 modificato da noi validato è stato l'unico primer reverse utilizzato in fase diagnostica e si è dimostrato in grado di evidenziare un riarrangiamento clonale in 85 campioni su 89.

La prima prova eseguita con questa tecnica è stata quella di confrontare i pattern di sangue periferico di soggetti sani, iperplastici e linfomatosi in fase di ammissione. La visualizzazione su gel di poliacrilammide di questa prima prova ha determinato difficoltà interpretative legate alla presenza di una banda del peso atteso in tutti e tre i tipi di campione. Tuttavia, la banda presente sui soggetti sani ed iperplastici, era caratterizzata da margini sfumati e da un lieve smear pattern, mentre quella presente sui soggetti linfomatosi è risultata discreta, dominante e priva di trascinamento.

La prova eseguita sul primo dei due soggetti inclusi nello studio ha determinato l'evidenza di una banda simile a quella dei campioni linfomatosi in ammissione, in tutti i campioni disponibili. Tuttavia le difficoltà interpretative riscontrate in generale nella visualizzazione su gel hanno determinato la scelta di sottoporre tutti i campioni ad analisi di frammento.

I risultati di questa prova hanno sottolineato la differenza esistente tra campioni neoplastici e non neoplastici ma soprattutto hanno evidenziato la persistenza di un clone neoplastico identico in tutti i campioni del soggetto N°1, che ha mostrato una recidiva clinica precoce.

Il secondo soggetto che ha avuto una remissione clinica molto duratura ha evidenziato la persistenza del clone associata tuttavia, ad un'oscillazione quantitativa dello stesso. Il clone neoplastico sembrava diminuire quantitativamente dopo 4 mesi dal termine del protocollo chemioterapico per riaumentare nel prelievo effettuato il mese successivo. Tale aumento ha prodotto un picco costante in altezza fino alla recidiva, avvenuta 2 mesi dopo.

E' bene sottolineare come tutti e due i soggetti abbiano mostrato una persistenza del clone neoplastico nonostante la remissione clinica della sintomatologia. Questo è il primo studio nel quale vengono analizzati con elettroforesi capillare campioni per il monitoraggio della Malattia Residua Minima ottenuti con una tecnica PCR validata appositamente per tale scopo e nonostante l'esiguità del numero di soggetti studiati i risultati di questa prova sperimentale suggeriscono alcune ipotesi riguardo alla possibilità di quantificare il clone neoplastico residuo.

Nell'analisi di frammento, la valutazione quantitativa del picco monoclonale è possibile tramite la quantificazione dell'area sotto la curva, ma è relativa all'altezza dello standard di riferimento elaborato dal software, pertanto non si tratta di una valutazione quantitativa in senso assoluto. Una possibilità è quella di confrontare l'altezza del picco prodotto da Cmi (utilizzato come controllo DNA positivo), con l'altezza del clone neoplastico in corsa multiplex, per avere un termine di paragone costante e definire così la reale altezza dei picchi. Un passo successivo potrebbe essere quello di validare una PCR Real-Time, in grado di misurare ad ogni ciclo PCR il prodotto amplificato, come avviene in medicina umana dove la quantificazione del clone neoplastico residuo è divenuta più importante a fini prognostici della presenza/assenza del clone (Cazzaniga e Biondi, 2005).

Come è stato riportato nel secondo Capitolo di questa tesi, molte neoplasie linfoproliferative sono caratterizzate da persistenza del clone neoplastico poichè aumentando nel tempo la sensibilità dei test diagnostici si è riusciti ad individuare un clone neoplastico in molti più casi, anche in quelli caratterizzati da remissioni cliniche lunghe od andamenti indolenti della neoplasia, ridefinendo il concetto di remissione molecolare (Paietta, 2002). Per tutti questi motivi la quantificazione del clone neoplastico, se supportato dall'evidenza di persistenza clonale in un'ampio studio casistico e correlato a dati prognostici potrebbe rappresentare una delle prospettive di studio della malattia residua minima in corso di linfoma nel cane.

BIBLIOGRAFIA

- **Arun S.S., Breuer W., Hermanns W.** “ Immunohistochemical examination of light-chain expression (Lambda/Kappa ratio) in canine, feline, equine, bovine and porcine plasma cells”. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A.*, 43(9): 573-76, 1996.
- **Avery P.R., Avery A.C.** “Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their importance in transitional neoplastic states”. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(4): 196-207, 2004.
- **Ben-Ezra J., Hazelgrove K., Ferriera-Gonzales A., Garrett C.T.** “ Can Polymerase Chain Reaction Help Distinguish Benign From Malignant Lymphoid Aggregates in Bone Marrow Aspirates?” *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 124: 511-515, 2000.
- **Bende R: J., Smit L.A., van Noesel C.J.M.** “Molecular pathways in follicular lymphoma”. *Leukemia*, 21: 18-29.
- **Biondi A., Valsecchi M.G., Seriu T., D’Aniello E., Willmse M.J., Faschino K., Pannunzio A., Gadner H., Schrappe M., Kamps W.A., Bartram C.R., van Dongen J.J., Panzer-Grumayer E.R.** “Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features. A case control study of the International BFM study group”. *Leukemia*, 14(11): 1939-1943, 2000.

- **Braziel R.M., Shipp M.A., Feldman A.L., Espina V., Winters M., Jaffe E.S., Petricoin III E.F., Liotta L.A.** “Molecular diagnostics”. *Hematology* 1: 279, 2003.
- **Brisco M.J., Hughes E., Neoh S.H., Sykes P.J., Bradstock K., Enno A., Szer J., McCaul K., Morley A.A.** “Relationship Between Minimal Residual Disease and Outcome in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia”. *Blood*, 87(12): 5251-5256, 1996.
- **Bruggemann M. Pott C., Ritgen M., Kneba M.** “Significance of minimal residual disease in lymphoid malignancies”. *Haematologica*, 112(1-2): 111-119, 2004.
- **Burnett R.C., Vernau W., Modiano J.F., Olver C.S., Moore P.F., Avery A.C.** “Diagnosis of Canine Lymphoid Neoplasia Using Clonal Rearrangements of Antigen Receptor Genes”. *Veterinary Pathology*, 40: 32-41, 2003.
- **Busch K., Borkharrdt A., Wobmann W., Reiter A., Harbott J.** “Combined polymerase chain reaction methods to detect c-myc/IgH rearrangement in childhood Burkitt’s lymphoma for minimal residual disease analysis”. *Haematologica*, 89: 818-825, 2004.
- **Cazzaniga G., Biondi A.** “Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology”. *Haematologica*, 90: 382-390, 2005.
- **Cavé H.** “Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia”. In: *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 1999.
- **De Paepe P., De Wolf-Peeters C.** “Diffuse large B-cell lymphoma: a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas comprising

several distinct clinicopathological entities”. *Leukemia*, 21: 37-43, 2007.

- **Dolken G.** “Detection of minimal residual disease”. *Advances in cancer research*, 82: 1333-177, 2001.
- **van Dongen J.J.M., Langerak A.W., Bruggemann M., Evans P.A.S., Hummel M., Lavender F.L., Delabesse E., Davi F., Schuurin E., Garcia-Sanz R., van Krieken J.H.J.M., Droese J., Gonzalez D., Bastard C., White H.E., Spaargaren M., Gonzalez M., Parreira A., Smith J.L., Morgan G.J., Kneba M., Macintyre E.A.** “Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936”. *Leukemia*, 17: 2257-2317, 2003.
- **Donovan J.V., Ladetto M., Zou G., Neuberg D., Poor C., Bowers D., Gribben J.G.** “Immunoglobulin heavy-chain consensus probes for real-time PCR quantification of residual disease in acute lymphoblastic leukaemia”. *Blood*, 95(8): 2651-2658, 2000.
- **Gentilini F., Calzolari C., Turba M.E., Agnoli C., Fava D., Forni M., Famigli Bergamini P.** “Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 activity in lymphoma-affected dogs”. *Leukemia Research*, 29(11): 1263-1269, 2005.
- **Jilani I., Keating M., William W., Kantarjian H., O’Brien S., Giles F.J., Albitar M.** “Simplified sensitive method for the detection of B-cell clonality in lymphoid malignancies”. *Clinical and Laboratory Haematology*, 28: 325-331, 2006.

- **Jung D., Giallourakis C., Mostoslavsky R., Alt F. W.** “Mechanism and control of V(D)J recombination at the Immunoglobulin Heavy chain locus”. *Annual reviews of Immunology*, 24:541-570, 2006.
- **Kehoe J.M., Capra J.D.** “ Sequence Relationship among the Variable Regions of Immunoglobulins Heavy Chain from Various Mammalian Species”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8): 2052-2055, 1972.
- **Keller R.L., Avery A.C., Burnett R.C., Walton J.A., Olver C.S.** “Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement”. *Veterinary Clinical Pathology*, 33(3): 145-149, 2004.
- **Knapp D.W., Waters D.J.** “ Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans”. *Molecular Medicine Today*, 3(1): 8-11, 1997.
- **Kocyan G.** “BEST PRACTICE No 185 Cytological and molecular diagnosis of lymphoma” *Journal of Clinical Pathology* 58: 561-567, 2005.
- **Harris N.L., Jaffe E.S., Diebold J., Flandrin G., Muller-Hermelink H.K., Vardiman J., Lister A.T., Bloomfield C.D.** “The World Health Organization Classification of Hematological Malignancies Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997”. *Modern Pathology*,13(2): 193-207, 2000.
- **Harris L.N., Stein H., Coupland S.E., Hummel M., Dalla Favera R., Pasqualucci L., Chan W.C.** “New approaches in lymphoma diagnosis”. *Hematology*: 194-220, 2001.

- **Lana S.E., Jackson T.L., Burnett R.C., Morley P.S., Avery A.C.** “Utility of Polymerase Chain Reaction for Analysis of Antigen Receptor Rearrangement in Staging and Predicting Prognosis in Dogs with Lymphoma”. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20: 329-334, 2006.
- **Lewin B.** “La diversità immunitaria”. In Lewin B., *Il Gene VIII*. Bologna, Zanichelli Editore: 782-817, 2006.
- **Marchalonis J.J., Schluter S.F.** “Evolution of variable and constant domains and joining segments of rearranging immunoglobulins”. *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, 3: 2469-2480, 1989.
- **Matsuda F., Ishii K., Bourvagnet P., Kuma K., Hayashida H., Miyata T., Honjo T.** “The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus”. *Journal of Experimental Medicine* 188(11): 2151-2162, 1998.
- **Medeiros L.J., Carr J.** “Overview of the Role of Molecular Methods in the Diagnosis of Malignant Lymphoma”. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 123(12): 1189-1207, 1999.
- **Modiano J.F.** “Immunoglobulins”. In Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C., *Schalm’s Veterinary Hematology*. S. Louis, Mosby: 904-909, 2000.
- **Morrison S., Neuberger M.S.** “Antigen recognition by B-cell and T-cell receptor”. In Janeway C., Travers P., Walport M., Shlomichik M., *Immunobiology*. New York, Garland Publishing, 2001.
- **Paietta E.** “Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept?” *Bone Marrow Transplantation*, 29: 459-465, 2002.

- **Provan D., Bartlett-Pandite L., Zwicky C., Neuberg D., Maddoks A., Corradini P., Soiffer R., Ritz J., Nadler L.M., Gribben J.G.** “Eradication of Polymerase Chain Reaction-Detectable Chronic Lymphocytic Leukemia Is Associated With Improved Outcome After Bone Marrow Transplantation”. *Blood*, 88(6): 2228-2235, 1996.
- **Ramasamy I., Brisco M., Morley A.** “Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms”. *Journal of Clinical Pathology*, 45:770-775, 1992.
- **Rezuke W.N., Abernathy E.C., Tsongalis G.J.** “Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications”. *Clinical Chemistry*, 43: 1814-1823, 1997.
- **Richards M.H., Nelson J.L.** “The Evolution of Vertebrate Antigen Receptors: A Phylogenetic approach”. *Molecular Biology and Evolution*, 17(1): 146-155, 2000.
- **Tamura K., Yagihara H., Isotani M., Ono K., Washizu T., Bonkobara M.** “Development of the polymerase chain reaction assay based on the canine genome database for detection of monoclonality in B cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 110: 163-167, 2006.
- **Theodorou I., Bigorgne C., Delfau M.H., Lahet C., Cochet G., Vidaud M., Raphael M., Gaurland P., Farcet J.P.** “VJ Rearrangements of the TCR γ Locus in peripheral T-cell Lymphomas: analysis by Polymerase Chain Reaction and denaturing gradient gel electrophoresis”. *Journal of Pathology*, 178: 303-310, 1996.

- **Thomas R., Smith K.C., Ostrander E.A., Galibert F., Breen M.** “Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probe”. *British Journal of Cancer*, 89: 1530-1537, 2003.
- **Tutter A., Riblet R.** “Conservation of an Immunoglobulin Variable Region gene Family Indicate a Specific Noncoding Function”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 7460-7464, 1989.
- **Uchiyama M., Maesawa C., Yashima A., Tarusawa M., Satoh T., Ishida Y., Ito S., Murai K., Enomoto S., Utsugisawa T., Moroyoshi K., Masuda T.** “Development of consensus fluorogenically labeled probes of the immunoglobulin heavy-chain gene for detecting minimal residual disease in B-cell non-Hodgkin lymphomas”. *Cancer Sciences*, 94(10): 877-885, 2003.
- **Winkler S., Murua Escobar H., Reimann-Berg N., Bullerdiek J., Nolte I.** “Cytogenetic investigations in four canine lymphomas”. *Anticancer Research* 25(6b): 3995-3998, 2005.
- **Wilson I.A., Cresswell P., Davis M.M., Allen P.M., Trowsdale J.** “The generation of lymphocyte antigen receptors”. In Janeway C., Travers P., Walport M., Shlomchik M., *Immunobiology*. New York, Garland Publishing, 2001.
- **Yagihara H., Tamura K., Isotani M., Ono K., Washizu T., Bonkobara M.** “Genomic organization of the T-cell receptor γ gene and PCR detection of its clonal rearrangements in canine T-cell lymphoma/leukaemia”. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115: 375-382, 2007.

- **Yang M. H., Yen C.C., Chiang S.C., Bai L.Y., Lee K.D., Hsiao L.T., Chao T. C., Wang W.S., Liu J.H., Chen P.M.** “Prognostic significance of clonal diversity of immunoglobulin rearrangements in patients with diffuse large B-cell lymphoma”. *Oncology Reports* 13(3): 503-508, 2005.
- **Vail D.M.** “Lymphoma”, In Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C., *Schalm’s Veterinary Hematology*. St.Luis, Mosby, 620-626, 2000.
- **Vail D.M., MacEwen E.G.** “Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer”. *Cancer Investigations* 18(8): 781-792, 2000.
- **Van der Velden V.H.J., Boeckx N., Van Weing E.R., Van Dongen J.J.M.** “Detection of minimal residual disease in acute leukaemia”. *Journal of Biological regulators and Homeostatic Agents*, 18: 146-154, 2004.
- **Vernau W., Moore P.F.** “ An immunophenotyping study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction”. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 69: 145-164, 1999.
- **Vernau W.** “Clonal Rearrangements of Antigen Receptor Genes in the Diagnosis of Lymphoid Neoplasia”. *Proceedings of 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) and 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP)*, Middleton, Wisconsin 2004.