



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**RUOLO DELLA FISH NELLA DIAGNOSI DEI LINFOMI  
DIFFUSI A GRANDI CELLULE B**

Relatore: Chiar.ma Dott.ssa  
**Elena Antaldi**

Tesi Laurea di:  
**Alessandro Cogni**

Anno Accademico 2022-2023

# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	<b>1</b>
<b>1 LINFOMA DIFFUSO A GRANDI CELLULE B (DLBCL)</b> .....	<b>2</b>
1.1 Definizione ed epidemiologia del Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) .....	2
1.2 Fattori eziologici .....	3
1.3 Diagnosi istopatologica .....	4
1.4 Criteri diagnostico-classificativi .....	6
1.4.1 Morfologia e Immunofenotipo .....	6
1.4.2 Nuovi principi di classificazione .....	7
<b>2 PATOGENESI MOLECOLARE NEI DLBCL</b> .....	<b>11</b>
2.1 Caratterizzazione biologica dei DLBCL .....	11
2.2 Caratteristiche citogenetiche .....	13
2.2.1 C-MYC .....	14
2.2.2 BCL2 (B-Cell Leukemia/Lymphoma 2) .....	18
2.2.3 BCL6 (B-Cell Lymphoma 6) .....	22
<b>3 ANALISI CITOGENETICA: FISH</b> .....	<b>24</b>
3.1 Principi alla base dell'interfase FISH .....	25
3.2 Tipi di sonde per il rilevamento delle traslocazioni .....	25
3.3 Preparazione delle Sezioni .....	28
3.4 Principi di valutazione FISH .....	30
3.5 Scelta dell'area di valutazione .....	31
3.6 Artefatti di troncamento .....	31
3.7 Controlli negativi e determinazione dei valori limite (cut-off) .....	32
3.8 Anomalie cromosomiche complesse .....	34
<b>4 PARTE SPERIMENTALE</b> .....	<b>35</b>
4.1 Scopo della tesi .....	35
4.2 Materiali e metodi .....	35
4.2.1 Strumento utilizzato per le indagini di ibridazione in situ fluorescente(FISH) .....	36
4.2.2 Sonde Break-apart .....	37
4.2.3 Allestimento del protocollo FISH : preparazione sonde break apart MYC,BCL2 e BCL6 .....	40

<i>4.2.4 Lettura ed interpretazione del segnale</i> .....	45
<i>4.3 Risultati</i> .....	51
<i>4.3.1 Discussione dei dati</i> .....	53
<b>CONCLUSIONI</b> .....	<b>58</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>59</b>

## INTRODUZIONE

I linfomi sono neoplasie del sistema immunitario che originano dai linfociti B e/o T/NK in diverse fasi della loro differenziazione.

I linfomi diffusi a grandi cellule B (DLBCL) rappresentano il sottotipo più frequente di linfoma non Hodgkin (LNH).

Ad oggi, la moderna diagnostica istopatologica, oltre ad una disponibilità di tessuto qualitativamente e quantitativamente adeguato ed una corretta applicazione dei principi classificativi, richiede la conoscenza e la combinazione di parametri morfologici, profili fenotipici, caratteristiche molecolari e citogenetiche.

Questo approccio metodologico avvia necessariamente ad un avanzamento delle procedure molecolari e genetiche all'interno dei laboratori di Anatomia Patologica.

Alla luce di questo, il lavoro di tesi consiste nel valutare il ruolo della tecnica molecolare di ibridazione in situ fluorescente (FISH) nella caratterizzazione molecolare dei linfomi diffusi a grandi cellule B, nel particolare si valuterà lo stato genetico di C-MYC, BCL2 e BCL6.

## **1 LINFOMA DIFFUSO A GRANDI CELLULE B (DLBCL)**

### *1.1 Definizione ed epidemiologia del Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL).*

Il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) è il tipo più comune di linfoma non Hodgkin (NHL), che rappresenta circa il 40% dei casi di NHL.<sup>1</sup>

Il DLBCL rappresenta una malattia eterogenea con un decorso clinico molto variabile, attualmente trattata con combinazioni di immuno e chemioterapia.

Sulla base dell'analisi del profilo di espressione genica, questa singola categoria diagnostica può essere classificata in distinti sottotipi fenotipici, che differiscono in caratteristiche molecolari e cliniche e che riflettono l'origine di stadi specifici di differenziamento della cellula durante la reazione del centro germinativo<sup>2</sup>.

Durante l'ultimo decennio, sono state identificate molteplici alterazioni genetiche ricorrenti associate a DLBCL.

La malattia è aggressiva e i pazienti presentano tipicamente linfadenopatia in rapida espansione e sintomi specifici, che richiedono un trattamento immediato.

Sebbene la maggior parte dei pazienti presenti linfadenopatia, vi è un'alta frequenza di malattia extranodale.

Nonostante la sua natura clinica aggressiva, il DLBCL è spesso curabile con il trattamento appropriato.

Il linfoma non-Hodgkin (NHL) ha un'incidenza annuale di circa 16-24 casi per 100.000 persone negli Stati Uniti e rappresenta il 4,3% di tutti i tumori di nuova diagnosi.<sup>3</sup>

Dai dati del registro tumori di Modena relativi al periodo 1997-2003, risulta, per i DLBCL, un'incidenza standardizzata per età pari a 4.8 casi/100.000 persone/anno.<sup>4</sup>

L'età media alla manifestazione clinica di malattia è di 66 anni, tuttavia, DLBCL può verificarsi a qualsiasi età. C'è un'incidenza leggermente più alta negli uomini (6,7 vs 4,6 casi per 100.000 persone, maschi vs femmine).<sup>5</sup> La probabilità di avere DLBCL aumenta con l'età, dallo 0,13% e 0,09% prima dei 39 anni all'1,77% e all'1,4% dopo i 70 anni rispettivamente negli uomini e nelle donne.<sup>5</sup> I tassi di sopravvivenza a 5 anni diminuiscono per età dal 78% per quelli di età < 55 anni al 54% per quelli di età ≥ 65 anni.<sup>6</sup>

## *1.2 Fattori eziologici*

Più frequentemente, il DLBCL si sviluppa de novo e la causa esatta della patologia è sconosciuta. In generale, il DLBCL non è una malattia ereditaria.<sup>7</sup> Tuttavia, il rischio di NHL, incluso il DLBCL, aumenta leggermente se un parente di primo grado ha una storia di NHL.<sup>8</sup> Circa il 9% dei pazienti con DLBCL ha un parente di primo grado (un genitore o un fratello) con linfoma o leucemia linfocitica cronica.<sup>7</sup>

Negli Stati Uniti, è più probabile lo sviluppo del DLBCL negli individui bianchi piuttosto che negli individui neri o asiatici americani.<sup>7</sup> Un rischio aumentato di DLBCL è stato osservato anche in associazione a patologie o condizioni che sopprimono il sistema immunitario, tra cui patologie autoimmuni, trapianto di organi e immunodeficienze primarie o acquisite.<sup>7</sup> Gli agenti

eziologici dei LHN rimangono per gran parte sconosciuti; è comunque possibile ricordare tra i fattori eziologici che possono concorrere alla patogenesi di queste malattie le radiazioni, il benzene e i pesticidi.<sup>7</sup> Sono stati inoltre riconosciuti come fattori eziologici predisponenti allo sviluppo dei LHN alcuni agenti virali capaci di trasformare i linfociti influenzando direttamente il loro DNA, facendoli diventare cellule tumorali. I virus che trasformano i linfociti in globuli bianchi cancerosi includono il virus Epstein-Barr (EBV), che è spesso collegato a una concomitante infezione da HIV, e l'herpesvirus umano 8 (HHV8). L'infezione da EBV o HHV8 può determinare rispettivamente lo sviluppo del linfoma di Burkitt o del linfoma da versamento primario.<sup>7,9,10</sup> Questi virus possono anche causare sottotipi di DLBCL, inclusi DLBCL positivi per EBV e DLBCL positivi per HHV8.<sup>11,12</sup> Il sovrappeso o l'obesità possono aumentare il rischio di NHL, incluso DLBCL. Una dieta povera e la mancanza di esercizio fisico aumentano questo rischio.<sup>7</sup>

Diverse fonti suggeriscono che l'aumento del consumo di frutta e verdura e la diminuzione del consumo o l'eliminazione di zuccheri, alimenti trasformati e carni rosse riducano la probabilità di sviluppo di DLBCL.<sup>7,13-15</sup>

### *1.3 Diagnosi istopatologica*

La biopsia linfonodale escissionale costituisce il “*gold standard*” sia per formulare una diagnosi di linfoma che per la ricerca dei diversi marcatori immunomolecolari prognostico-predittivi e terapeutici. In casi particolari (linfonodi profondi difficilmente aggredibili chirurgicamente, soggetti particolarmente anziani e/o

con rilevanti comorbidità) può essere valutata, quale alternativa, l'effettuazione di un ago-biopsia con ago tranciante eco/TAC guidata. La diagnosi di linfoma, infatti, è usualmente posta su sezioni istologiche ottenute da campioni linfonodali escissi chirurgicamente. L'aspirazione con ago sottile ("fine-needle"), è invece generalmente sconsigliabile in quanto difficilmente in grado di fornire materiale quantitativamente adeguato anche per l'effettuazione di eventuali indagini ancillari.<sup>16</sup> La presentazione clinica della DLBCL è varia e dipende dal sito di coinvolgimento della malattia. Il coinvolgimento extranodale è comune e si osserva fino a un terzo dei pazienti al momento della diagnosi.<sup>17</sup> La presentazione extranodale più comune è nel tratto gastrointestinale, seguita da ossa, testicoli, milza, ghiandola salivare, tiroide, fegato, reni e ghiandola surrenale. Il DLBCL è una malattia aggressiva, con tumori che mostrano un rapido tasso di crescita e pazienti che presentano grandi masse che si infiltrano nei tessuti o ostruiscono gli organi. I pazienti presentano spesso sintomi B, tra cui febbre, sudorazione notturna e perdita di peso. DLBCL è clinicamente, morfologicamente e geneticamente un tumore linfoide maligno altamente eterogeneo. Può derivare da cellule B mature in diversi stadi di differenziazione. Le mutazioni genetiche promuovono cambiamenti nelle cellule B, modificando così la loro espressione genica e promuovendo la trasformazione neoplastica. Queste cellule linfoidi hanno una dimensione nucleare uguale o superiore ai normali nuclei macrofagici o più del doppio delle dimensioni di un linfocita normale.<sup>18</sup> Solo alcuni dei molti biomarcatori identificati (ma non sempre espressi) nelle cellule B maligne includono CD19, CD79a, CD20, PAX5 e CD22; altri marcatori che possono essere espressi con



frequenza variabile includono CD38 e CD138, CD30 (associato alla morfologia anaplastica) e CD5.<sup>19</sup>

#### *1.4 Criteri diagnostico-classificativi*

Studi morfologici, biologici e clinici hanno permesso la suddivisione di DLBCL in varianti morfologiche, sottogruppi molecolari e immunofenotipici e entità patologiche distinte. Tuttavia, un gran numero di casi rimane ancora biologicamente eterogeneo per i quali non esistono criteri chiari e accettati per la sottoclassificazione: questi sono collettivamente definiti DLBCL non altrimenti specificati (NOS).<sup>20</sup>

##### *1.4.1 Morfologia e Immunofenotipo*

Secondo la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) del 2016, la DLBCL può essere suddivisa in varianti morfologiche e immunologiche:

**Variante centroblastica:** una popolazione predominante di cellule linfoidi medio-grandi con nuclei da ovali a rotondi;

**Variante immunoblastica:** > 90% immunoblasti e grandi cellule con grandi nuclei;

**Variante anaplastica:** cellule da grandi a molto grandi e nuclei pleomorfi.

Altre varianti includono DLBCL cutaneo primario, DLBCL positivo al virus di Epstein-Barr e DLBCL del sistema nervoso centrale primario. Inoltre, i sottogruppi di DLBCL possono essere

classificati in base al profilo di espressione genica, inclusi i tipi di cellule B del centro germinale (GCB) e cellule B attivate (ABC), che sono associati a specifiche alterazioni genetiche, diversi percorsi molecolari e risultati clinici.<sup>21</sup>

Ulteriori sottogruppi inclusi nella classificazione OMS che non rientrano strettamente nei sottotipi GCB o ABC includono quelli con linfoma a cellule B di alto grado con traslocazioni MYC e BCL2 e/o BCL6, denominati rispettivamente linfomi a double/triple-hit.<sup>22,23</sup> Queste mutazioni conferiscono una rilevanza prognostica in quanto i pazienti con mutazioni a double-/triple-hit spesso dimostrano esiti inferiori alla chemioterapia standard (rituximab, ciclofosfamide, vincristina, doxorubicina e prednisolone; R-CHOP).<sup>24</sup>

Più recentemente, una serie di studi sul profilo di espressione genica che utilizzano vari strumenti, tra cui il consensus clustering, array-based DNA copy-number analysis, e targeted amplicon resequencing, hanno permesso la separazione di DLBCL in più classificazioni con meccanismi patogenetici ed esiti distinti.

#### *1.4.2 Nuovi principi di classificazione*

I recenti progressi nella comprensione dei meccanismi immunogenetici e delle alterazioni genetico molecolari delle neoplasie ematopoietiche e in particolare linfoidi hanno consentito un approccio su base patogenetica della loro classificazione. Molti linfomi sono considerati distinte entità, caratterizzate da profili immunofenotipici e alterazioni genetiche note e identificabili con tecniche di laboratorio oggi ampiamente

diffuse e dotate di buona riproducibilità. La revisione 2016 della classificazione WHO5 riflette l'accordo tra ematopatologi, genetisti e clinici circa l'opportunità di fornire alcuni "updates" di entità già codificate, sia di introdurre alcune nuove forme "provisional". La revisione classificativa WHO definisce con maggior precisione le caratteristiche identificative e biomolecolari di alcune categorie, tra cui i linfomi diffusi a grandi cellule B; conferma definitivamente e riconosce alcune categorie precedentemente considerate "provisional" nell'edizione del 2008 (per esempio il linfoma a cellule B, non classificabile); e introduce a sua volta alcune nuove entità provvisorie (Tabella 1).

Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), NOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Si conferma la necessità di differenziare tra il tipo GCB e quello ABC/non-GC, mediante un algoritmo immunistoichimico; tale distinzione, può influenzare la scelta terapeutica.</li> <li>• La coespressione di MYC e BCL2 identifica un nuovo "subset" prognostico (linfomi "double-expressor").</li> <li>• Ampliata e migliorata la comprensione dello scenario mutazionale, con ricaduta ancora da definire in termini di impatto clinico.</li> </ul>
DLBCL NOS, EBV+	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Questa definizione sostituisce il "DLBCL EBV+ dell'anziano" dal momento che questa variante di linfoma può essere osservata anche in soggetti più giovani. Non include tutti quei linfomi a cellule B EBV+ che possono essere attribuiti ad altri specifici sottotipi.</li> </ul>
Linfomi a cellule B ad alto grado con traslocazioni di MYC e BCL2 e/o BCL6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Viene creata una nuova categoria ("high grade") con traslocazioni di Myc e bcl2 e/o bcl6, ad includere tutti i linfomi "double-/triple-hit" diversi dal linfoma follicolare e dal linfoma linfoblastico.</li> </ul>
Linfomi a cellule B ad alto grado, NOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Include tutti quei linfomi a cellule B con morfologia blastoide, non inquadrabili in altri istotipi, oltre a quei casi di linfoma non "double-/triple-hit", che sarebbero stati definiti, nella precedente classificazione, come inclassificabili</li> </ul>

**Tabella 1:** Principali modifiche apportate dalla revisione 2016 della classificazione WHO per le neoplasie linfoidi. Estratta da "Linee guida AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica), Linfomi, Edizione 2018"

Adattata da Swerdlow SH et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoidneoplasms. Blood. 2016;127(20):2375-90.

**Linfoma B diffuso a grandi cellule:** recenti studi molecolari con tecnica di "NGS" hanno dimostrato un differente profilo di alterazioni nei due sottotipi germinal center B-cell like (GCB)

(alterazione in EZH2, traslocazione di BCL2, mutazione in GNA13) e non GCB, activated B cell (ABC) (mutazioni in MYD88, CD79a, CARD11, TNFAIP3 attivanti i pathways BCR e NFkB). Si conferma l'importanza di una suddivisione dei linfomi B diffusi a grandi cellule, NOS nei due gruppi GCB e non GCB (ABC). Tale distinzione, con possibili ricadute terapeutiche, può essere ottenuta nella diagnostica routinaria mediante l'applicazione di un algoritmo immunoistochimico<sup>25</sup> basato su di un pannello anticorpale relativamente semplice ed affidabile (CD10, bcl6 e IRF4/MUM1). Sempre nei DLBCL NOS la coespressione immunoistochimica di C-MYC e BCL2 identifica la categoria dei *double expressor lymphoma*, caratterizzata da un andamento prognostico più sfavorevole. Il termine linfoma B diffuso a grandi cellule NOS EBV+ sostituisce il termine DLBCL dell'anziano, dal momento che tale linfoma può presentarsi in pazienti più giovani.

**Linfoma a cellule B non classificabile**, con caratteristiche intermedie tra il DLBCL ed il CHL: un linfoma di derivazione B con aree di sovrapposizione clinica, morfologica e/o immunofenotipica tra un CHL ed un DLBCL, soprattutto nella sua variante a primitività mediastinica (timica). Questi linfomi sono conosciuti anche con il termine di "grey zone lymphoma". Più frequenti in giovani adulti (età compresa tra i 20 ed i 40 anni), sono rari in età pediatrica. Tipica la presentazione mediastinica, meno comuni le forme nodali, periferiche o profonde. Istologicamente all'interno del tumore si possono osservare aree con aspetti architettonici e citologici Hodgkiniani, alternate o frammiste ad aree con aspetti più simili a quelli di un DLBCL. Il

fenotipo delle cellule linfomatose è spesso aberrante rendendo difficile la distinzione del confine tra le due entità. Questo tipo di linfoma è caratterizzato da un decorso clinicamente aggressivo e da una prognosi meno favorevole sia rispetto al HL classico sia alla variante mediastinica del DLBCL.

**Linfomi a cellule B ad alto grado:** questa categoria raggruppa quei linfomi ad alto grado caratterizzati dalla presenza di una traslocazione di MYC e di BCL2 e/o BCL6.

Accanto a questa nuova categoria è introdotta la definizione di linfoma a cellule B ad alto grado NOS, a raggruppare quei casi di linfoma B con citologia blastoide privi delle traslocazioni di MYC e di BCL2 e/o BCL6, e non riconducibili ad un altro istotipo (mantellare, linfoblastico, etc.).

## 2 PATOGENESI MOLECOLARE NEI DLBCL

### 2.1 Caratterizzazione biologica dei DLBCL

La letteratura internazionale ha evidenziato alcune caratteristiche molecolari dei DLBCL che ne condizionano la prognosi e, in prospettiva, la terapia<sup>26.27</sup>.

Ai fini di una buona pratica medica, una diagnosi istologica adeguata deve includere nel referto una valutazione dei parametri utili ad indirizzare la scelta terapeutica.

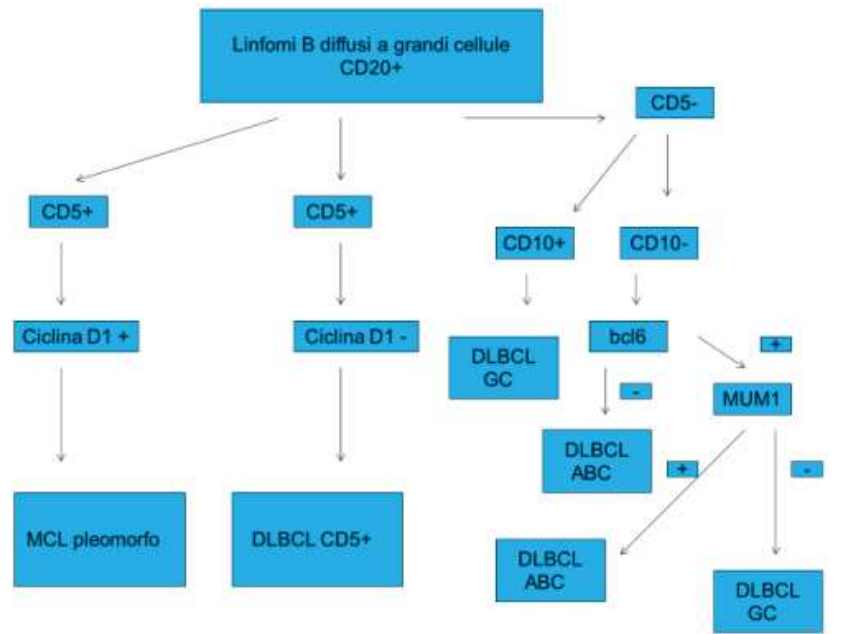
Il pannello immunoistochimico di base comprende:

- **Conferma della linea B cellulare:** le cellule neoplastiche devono esprimere gli antigeni della linea B CD20 e/o CD79a; utile testare l'anticorpo anti CD5 che, se coespresso, consente l'identificazione di un "subset" di DLBCL CD5+ clinicamente più aggressivi.
- **Profilo istogenetico o "Cell of Origin":** CD10, bcl6, MUM1
  - **GC-type:** immunofenotipo espresso dalle cellule neoplastiche = CD10>30% e/o bcl6>30% con MUM1<30%.
  - **Non-GC-type:** immunofenotipo espresso dalle cellule neoplastiche = CD10<30%, MUM1>30% bcl6<30%. È opportuno includere nel referto la percentuale di positività dei singoli anticorpi.
- **Identificazione delle forme "Double expressors":**C-MYC, BCL2.

È necessario includere nel referto una valutazione dell'espressione della proteina C-MYC (clone Y69) e della proteina bcl2 nelle cellule neoplastiche utilizzando colorazioni immunoistochimiche. I valori soglia per definire la positività sono >40% per la proteina C-MYC (nucleare) e >50% per la proteina bcl2 (citoplasmatica). La definizione di positività è indipendente dall'intensità della colorazione. I dati della letteratura indicano che i DLBCL con doppia espressione di C-MYC/bcl2 hanno generalmente una prognosi peggiore ed appartengono più spesso al sottogruppo *non-GC-type*. Una percentuale di cellule con intensa positività per c-Myc >70% è spesso associata a traslocazione del gene MYC<sup>28</sup>.

#### **Attività proliferativa: Ki67**

È necessario indicare la percentuale di cellule tumorali positive per Ki67 (clone MIB1). In caso di distribuzione disomogenea nel tessuto, è opportuno segnalare un valore percentuale che sia rappresentativo della media, segnalando al contempo la distribuzione disomogenea del segnale di positività. Quando le caratteristiche clinico patologiche della malattia e i risultati dell'indagine immunoistochimica per c-Myc e bcl2, suggeriscono la possibilità di un linfoma a cellule B High grade (double/triple hit) è necessario approfondire con metodi molecolari (FISH). Nei casi in cui è richiesta la caratterizzazione FISH è opportuno effettuare in prima istanza la ricerca delle traslocazioni del gene MYC con sonda break apart, e solo in caso di positività procedere alla ricerca delle traslocazioni di BCL2 e BCL6. Nel caso di presenza di doppia o tripla traslocazione (double o triple hit) il DLBCL sarà riclassificato come linfoma High Grade.



**Figura 1.** Algoritmo immunofenotipico per la classificazione dei linfomi B diffusi a grandi cellule (DLBCL).

Estratta da “Linee guida AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica), Linfomi, Edizione 2018”

## 2.2 Caratteristiche citogenetiche

L'estrema eterogeneità genetica dei DLBCL è strettamente correlata a profonde alterazioni dell'assetto cromosomico, che comprendono sia anomalie di numero sia strutturali. Tra queste ultime sono rappresentate le traslocazioni cromosomiche. Quelle più comuni sono a carico dei geni IGH, BCL2, BCL6, C-MYC. La tipologia di traslocazione più frequente è quella che determina una rilocalizzazione di un oncogene nelle vicinanze di un enhancer del gene delle Ig o dei recettori delle cellule T.

La maggior parte dei pazienti con DLBCL presenta riarrangiamenti nelle catene pesanti e leggere delle immunoglobuline. Circa l'80% dei DLBCL esprime la proteina



della leucemia a cellule B o del linfoma 2 (BCL2), mentre il 70% esprime la proteina del linfoma 6 delle cellule B (BCL6). Una minoranza presenta mutazioni del gene MYC.<sup>29</sup>

### 2.2.1 C-MYC

La famiglia Myc dei fattori di trascrizione umani è stata identificata dopo aver scoperto l'omologia tra un oncogene portato dal virus aviario, la mielocitomatosi (v-myc) e il Myc cellulare (c-Myc), un gene umano che è spesso sovra espresso in diversi tipi di cancro. Altri due fattori di trascrizione, n-Myc e l-Myc, sono stati successivamente aggiunti alla famiglia.

Questo gene è un protooncogene e codifica per una fosfoproteina nucleare che svolge un ruolo nella progressione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nella trasformazione cellulare.

MYC è una proteina di 62 kDa (439 amminoacidi) e appartiene alla classe dei fattori di trascrizione basic-helix-loop-helix-zipper (bHLHZip). Il dominio di transattivazione N-terminale (NTD) contiene il dominio di attivazione della trascrizione (TAD) e due box MYC, MBI e MBII, che sono elementi di sequenza altamente conservati coinvolti nella regolazione della trascrizione e nella stabilità proteica<sup>30</sup>. La porzione centrale di c-Myc contiene un segnale di localizzazione nucleare e due ulteriori elementi di sequenza conservati, MBIII e MBIV. Il dominio C-terminale contiene il motivo bHLHZip, che rimane parzialmente non strutturato finché non si dimerizza con un'altra proteina bHLHZip, MAX. Quindi forma una struttura alfa-elica ordinata, che è soggetta a molteplici modifiche post-traduzionali e interazioni proteiche che regolano la funzione di c-Myc<sup>30</sup>.

c-Myc è stato implicato in molteplici processi cellulari, tra cui proliferazione, differenziazione, apoptosi e metabolismo<sup>31</sup>. La struttura a quattro eliche di c-Myc e MAX si lega alle sequenze di DNA, come i motivi E-box (5'-CACGTG -3'), per controllare la trascrizione di geni specifici. È stato riportato che questi geni sono coinvolti nella modificazione della cromatina, nella replicazione del DNA e nella biogenesi ribosomiale e mitocondriale<sup>31</sup>. A causa del suo coinvolgimento in una varietà di funzioni cellulari, è fondamentale che c-Myc sia strettamente regolato. La trascrizione di c-Myc è controllata da segnali di sviluppo o mitogeni. Poiché l'mRNA di c-Myc è di breve durata, con un'emivita di circa 30 minuti, i livelli di proteina c-Myc possono essere rapidamente ridotti se i segnali regolatori positivi diminuiscono<sup>32</sup>. C-MYC può anche essere fosforilato, il che dirige la proteina verso la degradazione attraverso la via del proteasoma dell'ubiquitina<sup>33</sup>.

L'espressione di MYC è deregolata nel cancro da diversi meccanismi, tra cui traslocazioni cromosomiche, amplificazioni, mutazioni puntiformi, riprogrammazione epigenetica, traduzione migliorata e stabilità proteica aumentata. Nella maggior parte dei casi queste alterazioni portano ad un'espressione costitutiva della proteina MYC intatta, che normalmente è espressa solo durante alcune fasi del ciclo cellulare. Nel linfoma di Burkitt (BL), l'oncogene MYC viene attivato attraverso un reciproco t(8;14) o una sua variante che giustappone MYC/8q24 all'enhancer del locus delle catene pesanti delle immunoglobuline (Ig) sul cromosoma 14q32 o kappa o locus della catena leggera lambda sul cromosoma 2 o 22. Ci sono tre principali breakpoint di traslocazione in MYC; i breakpoint di classe I sono all'interno dell'esone 1 e del primo introne di MYC; i breakpoint di classe II si trovano all'estremità 5 del MYC e di solito entro poche kilobasi

dall'esone 1; i punti di interruzione di classe III sono distanti da MYC stesso e possono trovarsi a più di 100 kb di distanza. Il BL endemico mostra tipicamente breakpoint di traslocazione di classe II in MYC mentre il BL sporadico mostra spesso breakpoint di classe I di MYC. La t(8;14) o la sua variante è considerato un evento di iniziativa in BL. Le traslocazioni MYC/8q24 possono anche verificarsi come eventi secondari nei linfomi non BL come il linfoma diffuso a grandi cellule B, il linfoma follicolare, il linfoma a cellule del mantello e il mieloma multiplo<sup>34</sup>.

È documentato che MYC è ampiamente coinvolto in molti tumori, in cui si stima che la sua espressione sia elevata o deregolamentata fino al 70% dei tumori umani. La sovra espressione della proteina MYC non serve solo a guidare l'inizio e la progressione del tumore, ma è anche essenziale per il mantenimento del tumore. Inoltre, l'arresto della crescita, l'apoptosi e la differenziazione si verificano con la riduzione dei livelli di MYC. Queste caratteristiche rendono la molecola MYC un bersaglio molto attraente per la terapia del cancro. Tuttavia, la mancanza di una tasca profonda nella struttura della proteina MYC rende gli inibitori delle molecole tradizionalmente piccole non fattibili. Per questo vengono proposte altre strategie alternative. Un approccio suggerisce che l'interruzione del sito di legame MYC/MAX può essere una strategia per l'inattivazione della funzione MYC nelle cellule neoplastiche. Tale approccio era già stato applicato e sono già stati prodotti con successo diversi inibitori di piccole molecole che possono mirare specificamente a MYC. Un altro approccio si basa sull'inibizione dei dimeri MYC/MAX che si legano alle E-box nei promotori di diversi geni target MYC. Altri gruppi si sono concentrati sull'inibizione trascrizionale del gene MYC. Le prove preliminari degli esperimenti che utilizzano gli oligonucleotidi

antisense MYC sono state incoraggianti, ma non si sono tradotte in trattamenti clinici efficaci<sup>35</sup>.

Recentemente, il linfoma diffuso a grandi cellule B con riarrangiamenti di MYC e BCL2 o/e BCL6, il cosiddetto linfoma double hit o triple hit, è stato riconosciuto dalla revisione dell'OMS del 2016 come un sottoinsieme di un linfoma molto aggressivo<sup>36</sup>.

L'amplificazione del gene MYC è stata dimostrata in entrambi i tumori ematopoietici e non ematopoietici, inclusi i tumori del polmone, della mammella, del colon e della prostata. La mutagenesi inserzionale è osservata nei tumori indotti da retrovirus, come i tumori ematopoietici indotti dal virus della leucosi aviaria (ALV), in cui l'enhancer pro virale è integrato a monte del gene MYC e porta alla sua sovra espressione. La sovra espressione di MYC può verificarsi anche a causa di modifiche post-traduzionali. È frequente anche la sovra espressione della proteina MYC come risultato di mutazioni puntiformi nel dominio n-terminale. Il residuo mutato più frequentemente è Thr-58, trovato nel linfoma. Normalmente, la fosforilazione di Thr-58 può controllare la degradazione e la mutazione di MYC causando un aumento dell'emivita della proteina MYC nel linfoma.<sup>37</sup> Il rilevamento del riarrangiamento di MYC è importante nella diagnosi di BL e come marker prognostico in altri linfomi a cellule B aggressivi. Esistono diverse tecniche per rilevare la deregolazione di MYC, tra cui la citogenetica convenzionale, l'ibridazione fluorescente in situ (FISH) e l'immunoistochimica. Nel laboratorio clinico, la FISH è l'approccio più utilizzato.

### 2.2.2 BCL2 (*B-Cell Leukemia/Lymphoma 2*)

BCL2 è la pietra miliare dei geni regolatori dell'apoptosi. Contribuisce alla cancerogenesi bloccando la morte cellulare programmata in quanto tale, promuovendo la sopravvivenza cellulare. L'espressione aberrante del gene BCL2 è fortemente associata alla resistenza alla chemioterapia e alle radiazioni. Questa recensione delinea la struttura, la funzione e il ruolo del gene BCL2 nel cancro.

Il gene BCL2 codifica per una proteina di 26 kd costituita da 239 amminoacidi con un singolo dominio altamente idrofobo al suo c-terminale, che gli consente di localizzarsi principalmente nella membrana esterna mitocondriale e, in misura minore, nell'involucro nucleare e nella membrana di reticolo endoplasmatico.<sup>38</sup> Il ruolo principale della proteina BCL2 è quello di mantenere l'integrità della membrana mitocondriale, prevenendo il rilascio del citocromo c e il suo successivo legame con APAF1 (fattore di attivazione dell'apoptosi-1). La proteina contiene tutti e quattro i domini di omologia BCL2 (BH) (da BH1 a BH4). BH1, BH2 e BH3 costituiscono la fessura idrofobica attraverso la quale la proteina interagisce e forma omo ed eterodimeri con i membri pro-apoptotici della famiglia di proteine BCL2<sup>39</sup>. BCL2 aumenta la cinetica di sopravvivenza della cellula in particolare bloccando l'apoptosi. In questo modo impedisce alla cellula di intraprendere attività suicide che di solito richiedono ATP, nuovo RNA, sintesi proteica e induce una varietà di cambiamenti ultrastrutturali cellulari come il restringimento cellulare, la frammentazione nucleare e la degradazione del DNA.

La famiglia BCL2 è un prototipo di una grande famiglia di proteine evolutivamente correlate che condividono un alto grado di omologia sebbene esercitino funzioni diverse. Questa famiglia è composta da 25 membri pro-apoptotici e anti-apoptotici che interagiscono per mantenere un equilibrio tra cellule di nuova formazione e vecchie cellule morenti. Queste proteine sono localizzate nella membrana dei mitocondri e nel reticolo endoplasmatico, operando come guardiani di questi organelli<sup>40</sup>. Le proteine della famiglia BCL2 svolgono un ruolo centrale nella regolazione della morte cellulare e possono regolare diversi meccanismi di morte cellulare tra cui apoptosi, necrosi e autofagia. Sono i regolatori chiave della via mitocondriale dell'apoptosi. Questo percorso è necessario per il normale sviluppo embrionale e per prevenire il cancro. Queste proteine controllano la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna (MOM) che rilascia il citocromo c e altri fattori apoptotici nel citosol. Le proteine della famiglia BCL2 condividono fino a quattro domini di omologia BCL2 (BH1, BH2, BH3 e BH4) e sono generalmente divise in due categorie, proteine anti-apoptotiche e pro-apoptotiche in base alla loro funzione intracellulare e all'omologia di sequenza. Le proteine anti-apoptotiche, BCL2, BCL2L1 (BCL-XL), BCL2L2 (BCL-W), MCL1, BCL2A1 (A1/BFL-1), condividono l'omologia all'interno di quattro domini (BH1-4). Queste proteine formano una caratteristica piega a fascio elicoidale, che è fondamentale per la loro capacità di legarsi ai membri della famiglia BCL2 pro-apoptotici e quindi esercitare la loro funzione antiapoptotica. Le proteine pro-apoptotiche come BAX, BAK1 e BOK condividono i domini BH1-3 mentre altre proteine pro-apoptotiche, come BCL2L11 (BIM), BAD e BID, contengono solo il dominio BH3

e sono note come proteine solo BH3 (Figura 3). In situazioni normali, le sole proteine BH3 sono inattive o esistono a bassi livelli nella cellula. Tuttavia, in presenza di stimoli apoptotici, le proteine solo BH vengono attivate da modificazioni post-traduzionali o la loro espressione aumenta. La stimolazione delle proteine solo BH3 induce l'oligomerizzazione di BAX-BAK. Dopo la loro oligomerizzazione, BAX e BAK causano direttamente la permeabilizzazione del MOM, un passaggio critico nell'apoptosi<sup>41</sup>. Il ruolo delle proteine anti-apoptotiche BCL2 è quello di neutralizzare le proteine pro-apoptotiche solo BH3 e quindi inibire il loro effetto sull'attività BAX-BAK e sulla permeabilizzazione MOM. L'equilibrio tra proteine BCL-2 pro-sopravvivenza e pro-morte è un fattore importante nel determinare se le cellule subiscono l'apoptosi in risposta allo stress cellulare. Sebbene le proteine della famiglia BCL2 siano attori chiave nel controllo dell'apoptosi basata sui mitocondri, possono anche controllare la proliferazione cellulare. È stato riportato che alti livelli di proteina BCL2 sono associati a una minore capacità proliferativa del linfoma umano, suggerendo un controllo negativo sulla proliferazione. L'effetto antiproliferativo di BCL2 agisce principalmente a livello della fase G0/G1 del ciclo cellulare. Delezioni e mutazioni puntiformi nel gene BCL2 mostrano che in alcuni casi l'attività anti-proliferativa di BCL2 può essere dissociata dalla sua funzione anti-apoptotica<sup>42</sup>. Ciò indica che l'effetto di BCL2 sulla progressione del ciclo cellulare può essere un effetto diretto e non solo una conseguenza della sua attività anti-apoptotica. BCL2 sembra mediare il suo effetto antiproliferativo agendo su entrambe le vie di trasduzione del segnale (NFAT, ERK) e su specifici regolatori del ciclo cellulare.

Inoltre, BCL2 ha collaborato con MYC per promuovere la proliferazione dei precursori delle cellule B.

La t(14;18) (q32;q21) costituisce la traslocazione cromosomica più comune nei linfomi umani, essendo presente in oltre l'85% dei linfomi follicolari (FL) e fino al 30% dei linfomi diffusi a grandi cellule B (DLBCL).<sup>43-45</sup>

BCL2 si trova normalmente sul cromosoma 18q21.33 in un orientamento da telomero a centromero. Il gene BCL2 è coinvolto nella traslocazione cromosomica t (14;18) rilevata nella maggior parte dei linfomi follicolari e in alcuni linfomi diffusi B. In questa traslocazione il gene BCL2 sul segmento cromosomico 18q21 viene giustapposto al locus della catena pesante delle Ig in 14q32, provocando un'espressione non regolata dell'oncoproteina BCL2. I punti di interruzione sul cromosoma 18 sono raggruppati con una caduta del 50-60% all'interno di una regione del punto di interruzione principale (MBR) di 2,8 kb, situata nel 3'UTR del gene BCL2 e un altro 25% rientra nella regione del cluster minore (MCR)<sup>46</sup> (Bakhshi 1987, Willis e Dyer 2000). Altri si raggruppano all'interno di una terza regione di cluster intermedia a metà strada tra MBR e MCR, mentre altri punti di interruzione sono stati descritti sparsi in questa regione. Nelle traslocazioni varianti rare che coinvolgono i loci della catena leggera IG, t(2;18)(p12;q21) e t(18;22)(q21;q11.2), i breakpoint si trovano nel 5' regione non codificante del gene BCL2.

L'espressione dell'mRNA di BCL2 è up-regolata nell'allele traslocato attraverso l'azione delle sequenze potenziatrici di IGH, che sono altamente attive nelle cellule B del centro germinativo. Nei casi di riarrangiamenti che cadono nell'MBR, viene prodotto un trascritto di mRNA di fusione BCL2/IGH mentre i riarrangiamenti nell'MCR portano ad un aumento dei livelli di un



normale mRNA di BCL2<sup>47</sup>. La traslocazione t(14;18) o le sue varianti non interrompono la regione codificante per la proteina del gene BCL2 in modo che gli alleli normali e traslocati producano la stessa proteina di 26 kd, un membro di una famiglia di proteine coinvolte nella regolazione dell'apoptosi. Il meccanismo di ipermutazione somatica associato al gene IGH spesso induce mutazioni nel gene BCL2 che possono ulteriormente disregolare la sua espressione e possono anche portare a mutazioni puntiformi nelle regioni codificanti della proteina BCL2<sup>48</sup>. Pertanto, un sottogruppo di linfomi t(14;18) positivi non esprime la proteina BCL2 intatta a causa di mutazioni somatiche del gene. BCL2 è sovra regolato in quasi il 50% di tutti i tumori umani, in linea con il suo ruolo di regolatore apoptotico<sup>49</sup>. Esperimenti di trasferimento genico hanno dimostrato livelli elevati di questa proteina possono proteggere una vasta gamma di cellule da vari stimoli di morte cellulare da infezioni virali a farmaci anticancro che agiscono danneggiando il DNA e radiazioni.

### 2.2.3 BCL6 (*B-Cell Lymphoma 6*)

Le cellule B naïve mature migrano dal midollo osseo ai linfonodi, incontrano l'antigene, sono stimulate a proliferare e a differenziarsi ulteriormente in centroblasti nei centri germinali (GC) dei follicoli linfoidi. Lì, le cellule sono soggette a ipermutazione somatica e ricombinazione di cambio di classe, per differenziarsi ulteriormente in cellule B di memoria o plasmacellule. Questo processo richiede anche la presenza di

cellule T helper follicolari. BCL6 ha un ruolo importante in questo processo.

In particolare, BCL6 impedisce ad ATM e TP53<sup>50</sup> di indurre l'apoptosi in risposta a riarrangiamenti del DNA come quelli necessari per i processi di ipermutazione somatica e ricombinazione di cambio di classe. BCL6 è quindi essenziale per il normale sviluppo delle cellule B<sup>51</sup>.

Le traslocazioni cromosomiche che coinvolgono BCL6 si trovano nel 40% dei linfomi diffusi a grandi cellule B (DLBCL), nel 5-10% dei linfomi follicolari (FL) e nel 50% dei linfomi di Hodgkin a predominanza dei linfociti nodulari.

Le mutazioni nella regione autoregolatoria di BCL6 portano a un'espressione costitutiva di BCL6<sup>52</sup>.

Gli elementi di risposta IRF4 nel gene BCL6 mediano la repressione di BCL6. Le mutazioni nella regione di repressione IRF4 del gene BCL6 portano anche all'espressione costitutiva di BCL6<sup>53</sup>.

Riarrangiamenti di MYC, BCL2 e BCL6 sono stati rilevati rispettivamente nel 6%, 15% e 29% dei pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL). Riarrangiamenti doppi o tripli sono stati rilevati nel 3% di questi pazienti. Il riarrangiamento di MYC era associato a una sopravvivenza globale significativamente peggiore. Il riarrangiamento di BCL6 ha anche predetto una sopravvivenza globale significativamente più breve, in particolare per il fenotipo non GC<sup>54</sup>.

### **3 ANALISI CITOGENETICA: FISH**

La citogenetica, insieme all'analisi morfologica, molecolare ed immunofenotipica, riveste un ruolo importante nell'inquadramento diagnostico nei casi di DLBCL e prevede in prima istanza l'analisi del cariotipo, se possibile, e l'analisi FISH per la ricerca del riarrangiamento del gene MYC e, in caso di positività, dei geni BCL2 e BCL6.

Nell'ultimo decennio l'ibridazione in situ con fluorescenza interfase (FISH) è diventata una tecnica consolidata nella diagnosi e nella valutazione delle neoplasie linfoidi. Tuttavia, questa tecnica non è ampiamente utilizzata nella valutazione diagnostica di routine delle biopsie incluse in paraffina, molto probabilmente a causa della percezione che sia tecnicamente più impegnativa.

Ci sono anche incertezze riguardo alle soglie diagnostiche e al modo in cui i risultati dovrebbero essere interpretati.

E' fondamentale definire delle strategie pratiche per l'utilizzo dell'analisi FISH per rilevare anomalie cromosomiche associate al linfoma nelle biopsie di linfoma di routine incluse in paraffina. Inoltre, saper interpretare i risultati FISH (incluso come calcolare i livelli di cut-off per le sonde FISH), registrarli e riportarli.

### *3.1 Principi alla base dell'interfase FISH*

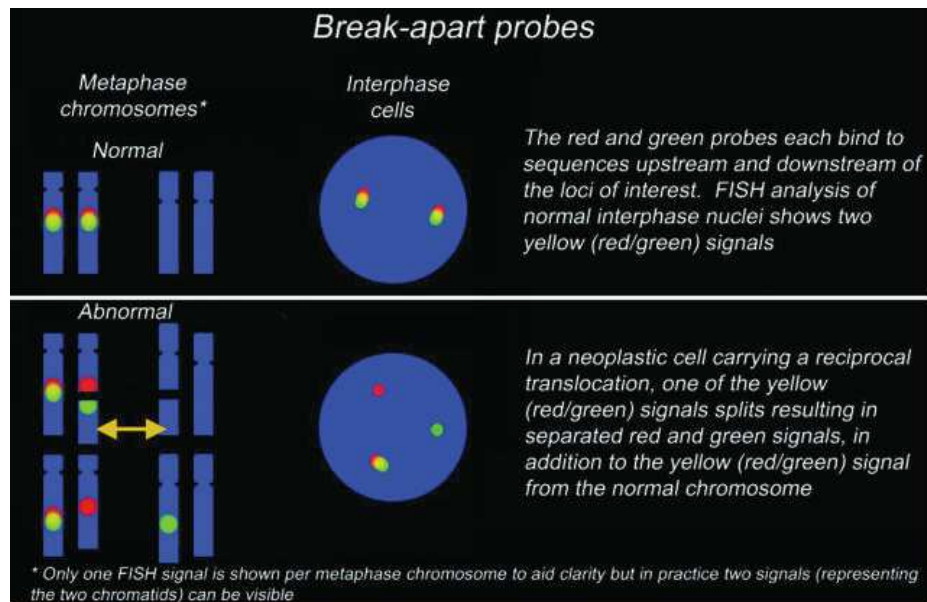
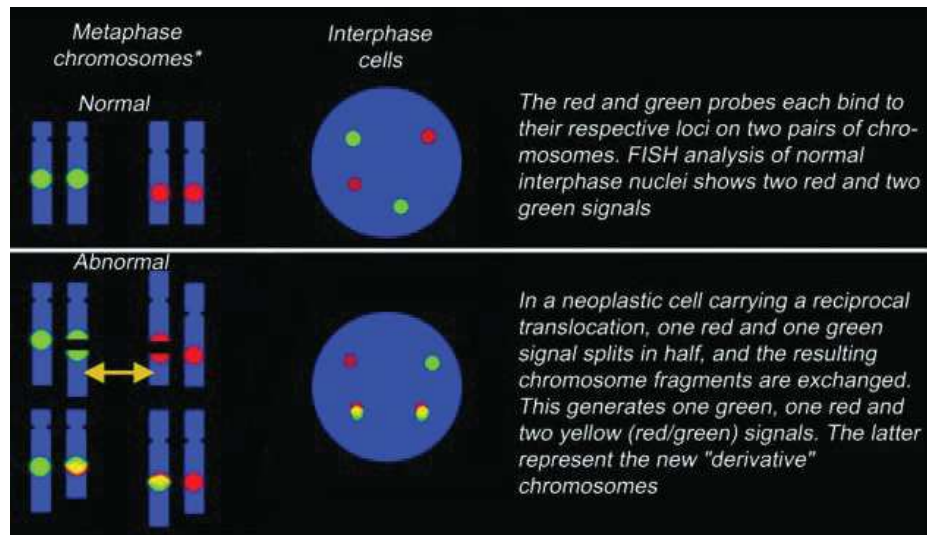
La metodologia FISH prevede il legame di frammenti di DNA a filamento singolo a sequenze target genomiche complementari in una preparazione cellulare o tissutale. Queste sonde di DNA sono etichettate, direttamente o indirettamente, con un fluorocromo, producendo un segnale fluorescente nettamente definito nel sito della sequenza bersaglio all'interno del nucleo<sup>55,56</sup>.

### *3.2 Tipi di sonde per il rilevamento delle traslocazioni*

Ci sono due categorie fondamentalmente distinte di sonde per la rilevazione delle traslocazioni. Tali sonde differiscono in termini di tipo di informazioni che forniscono, sensibilità e facilità di interpretazione.

Le sonde a doppia fusione sono costituite da coppie di sonde etichettate in colori distinti, con ciascuna sonda che si lega a un cromosoma diverso. A differenza delle sonde a fusione singola, che si trovano vicino al punto di interruzione della traslocazione e hanno una sensibilità inferiore, le sonde a doppia fusione sono progettate per coprire le regioni del punto di interruzione della traslocazione nei due diversi geni coinvolti in una traslocazione reciproca. Le sonde separabili sono costituite da coppie di due sonde singole di colore diverso (vale a dire, una rossa e una verde). Ciascuno si lega a sequenze che fiancheggiano la regione nota del punto di interruzione in un locus o gene di interesse, con la conseguenza che in una normale cellula diploide (a condizione

che il nucleo sia intatto) saranno visibili due serie di segnali fusi rosso/verde (rappresentanti i due alleli). In una cellula diploide anormale, in cui un allele è stato scisso da una traslocazione, sarà visibile un segnale rosso e verde separato (da qui il termine "break-apart") oltre al normale segnale fuso.



**Figura 2** Rappresentazione schematica delle caratteristiche delle sonde dual-fusion e break-apart. *JMolDiagn.* 2006 May; 8(2): 141–151, FISH Analysis for the Detection of Lymphoma-Associated Chromosomal Abnormalities in Routine Paraffin Embedded Tissue Roland A. Ventura,\* Jose I. Martin-Subero,† Margaret Jones,\* Joanna McParland,‡ Stefan Gesk,† David Y. Mason,\* and Reiner Siebert†.-

Sebbene le sonde break-apart possano rivelare la rottura all'interno di un locus specifico (e quindi, implicitamente, che sia presente una traslocazione), non definiscono l'altro gene coinvolto. Inoltre, poiché le sonde separate fiancheggiano il locus di interesse, è probabile che piccole inserzioni che portano a giustapposizioni oncogenetiche (ad es. l'inserimento di CCND1 nel locus IGH l'inserimento degli elementi regolatori IGH in CCND1) non vengano rilevate. Sebbene in questo senso siano meno informative delle sonde a doppia fusione, hanno il vantaggio che, se il design della sonda è appropriato, daranno risultati chiaramente anormali anche per traslocazioni varianti in cui sono coinvolti partner diversi, ad esempio t(8;14), t(2;8), t(8;22) per *MYC*. Inoltre, molti laboratori preferiscono le sonde separabili sulla base del fatto che i risultati sono più facili da interpretare perché l'anomalia ricercata (separazione di due segnali) è prontamente riconosciuta<sup>57,58</sup>. Tuttavia, i segnali normali possono occasionalmente sembrare leggermente separati quando si utilizzano sonde separabili, a seconda della localizzazione e della struttura secondaria del DNA, aumentando le possibilità di un risultato falso positivo. Pertanto, il modello "normale" deve essere accuratamente definito, ad esempio valutando la distanza tra i segnali in relazione al diametro del segnale. A seconda del design della sonda, del locus in esame e del materiale indagato, una coppia di segnali potrebbe essere valutata positivamente solo quando si osserva una certa distanza

(ad esempio, definita in relazione ai diametri del segnale) tra i segnali.

Un risultato positivo utilizzando sonde a doppia fusione richiede due segnali di fusione, un evento che è molto improbabile che si verifichi per caso. Pertanto, le sonde a doppia fusione sono, in senso stretto, superiori alle sonde separabili per quanto riguarda la sensibilità perché il loro tasso di falsi positivi sul tessuto normale è praticamente pari a zero<sup>58,59,60</sup>. Questo problema può essere particolarmente rilevante per rilevare bassi livelli di cellule tumorali nei linfomi con infiltrazione del midollo osseo o del sangue periferico e per rilevare una malattia residua minima. Tuttavia, in pratica, questo svantaggio teorico di solito non è significativo quando si studiano sezioni di tessuto perché la maggior parte delle biopsie di linfoma contiene molte cellule neoplastiche.

### *3.3 Preparazione delle Sezioni*

Diverse pubblicazioni in passato hanno raccomandato l'uso di sezioni più spesse di quelle utilizzate per l'istologia convenzionale, sulla base del fatto che ciò riduce al minimo il numero di nuclei che vengono troncati durante il sezionamento<sup>61,62,63</sup>. Tuttavia, le sezioni spesse presentano i propri svantaggi, principalmente la difficoltà di interpretare i segnali in molti diversi piani focali e di distinguere tra i singoli nuclei. Si deve considerare che le sezioni convenzionali conteranno nuclei troncati, in cui uno o più segnali FISH sono stati persi. Come accennato in precedenza, questo è problematico per rilevare le delezioni ma non per amplificazioni e traslocazioni. Di

conseguenza, le sezioni convenzionali (da 4 a 6  $\mu\text{m}$ ) sono generalmente preferite dagli autori.

Tutte le tecniche FISH applicate alle sezioni di tessuto di routine iniziano con le fasi di deparaffinazione e disidratazione, come per la colorazione (immuno) convenzionale, e questa è seguita da una fase cruciale di "demascheratura" in cui il tessuto viene sottoposto a trattamento chimico e/o ad alta temperatura per rendere accessibili alla sonda sequenze di DNA nucleare.

La maggior parte delle tecniche include una successiva fase proteolitica, riducendo così lo sfondo e migliorando la visibilità del segnale. Dopo questi passaggi, le sonde FISH vengono aggiunte alla sezione e sigillate sotto un coprioggetto. I campioni vengono quindi brevemente riscaldati (da 70 a 90°C) per denaturare il DNA genomico prima dell'ibridazione durante la notte (da 37 a 45°C). Queste due fasi di incubazione possono essere eseguite spostando i vetrini da un forno/bagno d'acqua a un altro o, in modo più conveniente e riproducibile ma anche più costoso, utilizzando un'apposita apparecchiatura di ibridazione in cui i vetrini vengono posizionati e non rimossi fino al completamento dell'ibridazione.

Le fasi di smascheramento (mediante riscaldamento o mezzi chimici) e il successivo trattamento proteolitico sono fondamentali per ottenere risultati FISH leggibili. Un pretrattamento insufficiente può determinare un'ibridazione debole o assente, mentre un pretrattamento prolungato può causare la separazione della sezione di tessuto dal vetrino. Poiché la fissazione e la processazione del tessuto variano notevolmente



da campione a campione (e spesso all'interno di una singola biopsia) e alcuni campioni non danno risultati soddisfacenti alla prima analisi, la tecnica può richiedere la ripetizione in condizioni diverse (p. es. smascheramento più lungo). Fattori come il tempo dall'intervento chirurgico alla fissazione, le dimensioni del campione, i parametri di fissazione e le condizioni di conservazione post-fissazione possono potenzialmente influenzare la qualità della FISH<sup>64</sup>. Ad esempio, l'uso di formalina tamponata è, nella nostra esperienza, associato ai migliori segnali di ibridazione. È importante notare che, pertanto, può essere difficile o impossibile eseguire con successo l'analisi FISH su alcune biopsie tissutali, indipendentemente dal numero di tentativi effettuati.

#### *3.4 Principi di valutazione FISH*

Quando si imposta un servizio FISH di ricerca o diagnostica per biopsie di linfoma di routine, la persona o le persone responsabili dell'interpretazione dei risultati devono acquisire esperienza di modelli di segnali normali e anormali per ciascuna sonda applicata, utilizzando tessuti negativi (ad esempio, tonsille di individui sani) e campioni positivi rilevanti (p. es., linfomi noti per contenere l'anomalia in esame). Quando si valutano i risultati dell'etichettatura FISH, è necessario tenere presente diversi fattori: l'architettura del tessuto, comprese le variazioni locali nel contenuto di cellule neoplastiche, la fissazione e la cellularità all'interno della sezione; la frequente presenza di nuclei troncati; e la complessa natura delle disposizioni genetiche osservate in alcune neoplasie linfoidi.

### *3.5 Scelta dell'area di valutazione*

L'analisi FISH è normalmente focalizzata sulle aree più ricche di cellule anormali. Tuttavia, l'intera area ibridata dovrebbe essere sottoposta a screening per la presenza di cambiamenti subclonali che potrebbero essere di importanza diagnostica e prognostica, ad esempio, la presenza di t(8;14) solo in una sottopopolazione potrebbe indicare la trasformazione in un linfoma più aggressivo. Pertanto, può essere utile avere a portata di mano una sezione colorata in modo convenzionale come riferimento. La variabilità sarà osservata anche all'interno della sezione in termini di conservazione del tessuto e dettaglio morfologico. Pertanto, le aree dovrebbero essere evitate in cui i confini dei singoli nuclei non sono chiaramente identificabili e/o l'elevata densità cellulare causa un'eccessiva sovrapposizione nucleare. Parallelamente alla revisione della qualità della sezione tissutale, dovrebbero essere valutati i segnali FISH, ricercando aree con maggiore espressione dell'immunoistochimica.

### *3.6 Artefatti di troncamento*

Quando si valutano le sezioni, si dovrebbe riconoscere che un numero considerevole di nuclei avrà perso una o più delle loro sequenze target riconosciute dalle sonde convenzionali, un fenomeno che è più evidente nei linfomi a grandi cellule. Tuttavia, possono essere riconosciuti e interpretati anche nuclei anomali che

hanno perso uno o più segnali a causa del troncamento. Ad esempio, quando si utilizzano sonde separate, un nucleo con un segnale fuso (segnale normale) e un segnale a colore singolo suggerisce una traslocazione (nell'ipotesi che l'altra sequenza "spezzata" traslocata sia stata rimossa mediante sezionamento). Allo stesso modo, utilizzando una sonda a doppia fusione. Tuttavia, nessuno di questi modelli in una singola cellula è un indicatore affidabile di traslocazioni classiche se non è accompagnato da una proporzione significativa di nuclei che mostrano anche un complemento anormale di segnali. Quando si valutano i campioni, è anche importante considerare la possibilità che i segnali vengano persi a causa di una perdita cromosomica piuttosto che di un troncamento cellulare.

### *3.7 Controlli negativi e determinazione dei valori limite (cut-off)*

Uno dei fattori più critici che influenzano una corretta interpretazione dei segnali FISH nei campioni diagnostici è la definizione di valori di cut off per le diverse sonde utilizzate e per tutti i modelli di segnale che potrebbero apparire con un determinato dosaggio. È ampiamente accettato che il cut off diagnostico sia calcolato come la media dei risultati falsi positivi in almeno cinque donatori sani più tre volte la deviazione standard. Per il materiale incluso in paraffina, le sezioni di routine di tessuto linfoide normale (p. es., tonsille) costituiscono controlli negativi appropriati. Va inoltre considerato che la perdita di uno dei cromosomi derivati coinvolti nella traslocazione è un evento non casuale nelle neoplasie delle cellule B, che determina una sola fusione invece di due.

Per le sonde separate, poiché l'estensione del divario tra i segnali rosso e verde dipende dalla diffusione dei punti di interruzione e dal design della sonda, è necessario stabilire un sistema di punteggio riproducibile. La strategia degli autori è quella di stimare visivamente la distanza relativa tra le sonde diversamente colorate di una coppia di segnali all'interno del nucleo e creare diverse categorie: 1) segnali sovrapposti, 2) segnali non sovrapposti, 3) distanza tra i segnali più di una volta il segnale diametro, 4) distanza tra i segnali più di due volte il diametro del segnale e 5) distanza tra i segnali più di tre volte il diametro del segnale. A nostro avviso, una sonda break-apart dovrebbe idealmente avere un cutoff compreso tra l'1 e il 5% quando la distanza tra i segnali fiancheggiati è due o tre volte il diametro del segnale stimato. Per le sonde mirate a rilevare le modifiche del numero di copie, l'istituzione di cut off per rilevare le delezioni nel materiale incluso in paraffina richiede una considerazione speciale perché il sezionamento induce artefatti di troncamento e, per definizione, il cut-off sarà più alto rispetto ai campioni contenenti nuclei intatti. Per quanto riguarda i livelli di cut off, bisogna sempre tener conto che, per la stragrande maggioranza dei saggi, questi sono influenzati dalla condensazione del DNA (la cromatina decondensata produce segnali più grandi), dalla dimensione del nucleo (nuclei più grandi sono più incline agli artefatti di sezionamento), il disegno del saggio (la distanza del segnale nei saggi di separazione dipende in parte dalla distanza genomica delle sonde), lo stato della ploidia (le cellule con copie soprannumerarie dei loci studiati hanno una maggiore probabilità di colocalizzazioni casuali), lo schema di etichettatura (l'etichettatura combinatoria può interferire con la

colocalizzazione del segnale) e altre variabili. Molte di queste variabili come la ploidia, la dimensione nucleare e la condensazione della cromatina possono variare notevolmente tra campioni di controllo normali e campioni tumorali. Pertanto, si dovrebbe tenere conto del fatto che questi fattori non possono essere modellati correttamente nei controlli negativi. Questo è di particolare importanza nei campioni con basso contenuto di cellule tumorali o cambiamenti subclonali.

### *3.8 Anomalie cromosomiche complesse*

I linfomi possono contenere più di un'anomalia cromosomica, in particolare quelle acquisite come eventi secondari. Questi sono spesso "invisibili" quando le cellule vengono analizzate per anomalie specifiche mediante la tecnica FISH, ma a volte possono dare origine a modelli che differiscono dalle alterazioni classiche (come descritto nella letteratura del produttore della sonda). Ad esempio, i casi di linfoma mantellare, linfoma follicolare e linfoma di Burkitt mostreranno frequentemente segnali di fusione extra e/o segnali extra loci. Questi modelli "insoliti" non dovrebbero essere ignorati ma dovrebbero essere considerati anormali e interpretati insieme ai rapporti patologici e ai rapporti pertinenti in letteratura. È quindi imperativo che lo specialista che esegue l'analisi sia consapevole della possibilità di modelli di segnali variabili, ed è consigliabile registrare accuratamente i modelli FISH in una serie di 100 nuclei, e solo allora trarre conclusioni da questi modelli. Se un osservatore osserva un vetrino cercando solo un modello previsto, i modelli varianti possono essere ignorati e può essere raggiunta una diagnosi errata.

## 4 PARTE SPERIMENTALE

### *4.1 Scopo della tesi*

Questo lavoro si prefigge lo scopo di analizzare mediante tecnica di ibridazione in situ fluorescente (FISH) anomalie cromosomiche, ovvero traslocazioni a carico dei geni MYC, BCL2 e BCL6 nei linfomi diffusi a grandi cellule B. Lo studio consiste nell'analisi di 30 campioni prelevati da pazienti di età media intorno a 83 anni con diagnosi di DLBCL. Il materiale è stato prelevato da aree linfonodali differenti, nel dettaglio addome, nasofaringe, linfonodi del collo, crurale, ascella, testa pancreaticata, nodulo polmonare e linfonodo inguinale.

### *4.2 Materiali e metodi*

Il materiale analizzato proviene da differenti centri ospedalieri sul territorio nazionale; ogni centro ha provveduto ad inviarci il blocchetto del materiale incluso in paraffina o direttamente le sezioni in bianco da processare. Nel caso in cui avevamo il blocchetto abbiamo provveduto al taglio di almeno sette sezioni dallo spessore di circa 4-5  $\mu\text{m}$ , nel particolare è stata tagliata una sezione su vetrino standard per la colorazione con ematossilina-eosina, mentre le altre sei sezioni sono state raccolte su vetrini con carica, in quanto tre sezioni necessarie per le indagini di immunohistochimica per la valutazione del MYC, BCL2 e BCL6,

ed altre tre sezioni per l'allestimento della tecnica FISH. Una volta tagliate, le sezioni sono state poste in stufa a 37°C overnight ed utilizzate per le indagini sopra descritte il giorno seguente.

#### *4.2.1 Strumento utilizzato per le indagini di ibridazione in situ fluorescente (FISH)*

I campioni che sono stati analizzati in questo studio sono stati sottoposti all'indagine FISH con sistema Leica BOND-MAX™ (Figura 3)



*Figura 3*

Lo strumento consente di automatizzare le procedure di colorazione per IHC e ISH. Attualmente nella SOD di Anatomia Patologica, tale strumento viene dedicato esclusivamente all'allestimento di preparati per l'ibridazione in situ fluorescente

(FISH). Nello strumento sono presenti taniche da riempire con reagenti pronti all'uso. Trovano posto i seguenti contenitori, da sinistra a destra, un reagente per lo smascheramento a pH 6 Epitope Retrieval solution1 (ER1), un reagente per lo smascheramento a pH 9 Epitope Retrieval solution2(ER2), un reagente per il processo di sparaffinatura (Dewax solution), acqua deionizzata, tampone di lavaggio (Wash Buffer previa diluizione con acqua distillata 1:25), alcool assoluto, rifiuti in bulk posto in un contenitore di rifiuti esterno da nove litri.

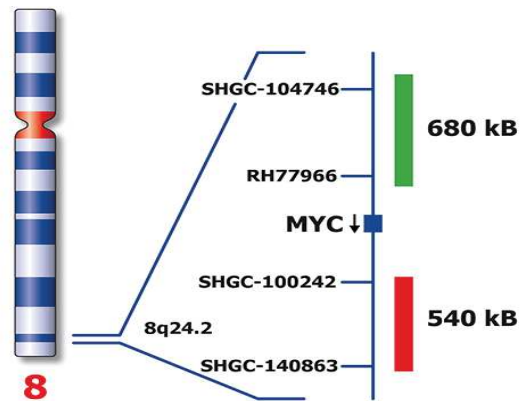
Il sistema prevede tre inserti portalamina indipendenti che consentono di caricare nella stessa seduta di analisi campioni che prevedono indagini con sonde differenti. La metodica è semi-automatica in quanto la preparazione dell'enzima per la digestione del tessuto in paraffina e la preparazione delle sonde è a carico dell'operatore tecnico.

#### *4.2.2 Sonda Break-apart*

La sonda MYC (8q24) è destinata all'uso su sezioni tessutali di linfomi fissate in formalina e incluse in paraffina. La sonda MYC rileva le traslocazioni che coinvolgono il gene di interesse. La sonda MYC (8q24) proximal è ottimizzata per la rilevazione delle regioni genomiche prossimali ai punti di rottura nella regione del gene MYC.

La sonda MYC distal è ottimizzata per l'identificazione delle regioni genomiche distali ai punti di rottura nella regione del gene MYC. (Figura 4)

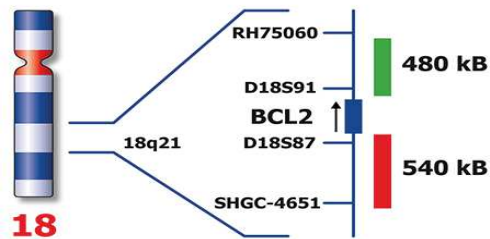




**Figura4:** mappa dei cromosomi che mostra la dimensione delle sonde in kilobasi, la banda cromosomica e la posizione genomica, definiti da marcatori STS. La freccia adiacente al gene indica direzione di trascrizione del gene.

Entrambe le sonde sono utilizzate in modo combinato per rilevare le traslocazioni del gene MYC in 8q24. La sonda MYC è stata progettata come analisi a due colori per rilevare le traslocazioni nella regione del gene MYC in 8q24, uno schema di segnale normale esibisce due segnali di fusione rosso/verde (2f), mentre una traslocazione che interessa il gene MYC produce un solo segnale di fusione per il cromosoma normale 8, oltre a un segnale rosso e uno verde per la traslocazione. La maggior parte delle sonde utilizzate nei laboratori diagnostici sono disponibili in commercio e sono direttamente marcate con fluorocromi. La scelta della sonda per l'analisi FISH del gene MYC è di fondamentale importanza, perché sonde commerciali diverse possono dare risultati controversi a seconda di come sono costruite; infatti, il pattern di segnali risultante è strettamente correlato alla grandezza della sonda e ai punti di rottura della traslocazione, con la conseguente possibilità di risultati falsi negativi o con pattern alternativo. La sonda BCL2 (18q21) identifica le traslocazioni genomiche che coinvolgono il gene BCL2. La sonda proximal serve per rilevare le regioni genomiche

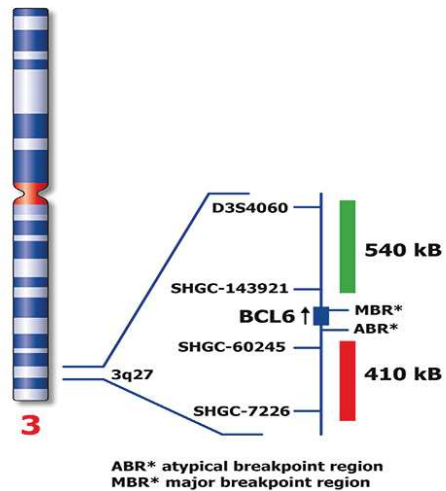
prossimali ai punti di rottura nella regione del gene BCL2. La sonda distal è ottimizzata per evidenziare le regioni genomiche distali ai punti di rottura nella regione del gene di interesse (Figura 5).



**Figura 5.** Mappa cromosomica che mostra le dimensioni della sonda in kb. La banda cromosomica è la posizione del genoma definiti dai marcatori STS. La freccia adiacente al gene indica la direzione di trascrizione del gene. In verde BCL2 prossimale mentre in rosso è indicata BCL2 distale.

La sonda BCL2 è stata invece progettata come analisi a due colori per rilevare le traslocazioni nella regione del gene BCL2 in 18q21. Uno schema di segnale normale esibisce due segnali di fusione rosso/verde (2f), mentre una traslocazione che interessa il gene BCL2 produce un solo segnale di fusione per il cromosoma normale 18, oltre a un segnale rosso e uno verde per la traslocazione.

La sonda BCL6 (3q27) rileva le traslocazioni genomiche che coinvolgono il gene BCL6. Presenta analogamente alle precedenti una porzione distale e una prossimale, con medesima esibizione dei segnali per la lettura del preparato. (Figura 6)



*Figura 6. Mappa cromosomica che mostra le dimensioni delle sonde in kilobasipair, la banda cromosomica e la posizione del genoma definiti da marcatori STS. In verde BCL6 prossimale, in rosso BCL6 distale.*

Tutte le sonde devono essere protette dalla luce forte e conservate alla temperatura di 2-8°C, il prodotto può essere utilizzato fino a quando raggiunge la data di scadenza indicata sull'etichetta del flacone.

#### 4.2.3 Allestimento del protocollo FISH per MYC, BCL2 e BCL6.

Prima di ogni procedura, il sistema Leica BOND-MAX™ effettua i controlli interni, innesca il sistema di fiducia e sposta il braccio robotizzato nelle rispettive posizioni iniziali. I vassoi per i vetrini si inizializzano e ritornano nella posizione sbloccata, prima di

processare si controlla sempre che il coperchio sia chiuso, i contenitori dei rifiuti non siano pieni, le provette della stazione di miscelazione siano vuote e i contenitori dei reagenti siano pieni per più della metà. Una volta che lo strumento ha terminato l'inizializzazione si procede alla preparazione delle sonde e dell'enzima di digestione. La preparazione tecnica delle sonde e dell'enzima è uguale per tutte le tre sonde testate. Si procede come segue:

#### Preparazione delle sonde break-apart:

Le sonde arrivano in formato concentrato 10x e devono essere combinate e diluite alla concentrazione finale 1x usando la BOND Hybridization solution.

Sonda MYC: si dispensa 800 µL di BOND Hybridization solution, e 100 µL di 8q24 proximal (green) e 100 µL di 8q24distal(red);

Sonda BCL2: si dispensa 800 µL di BOND Hybridization solution, e 100 µL di 18q21 proximal (green) e 100 µL di 18q21 distal (red);

Sonda BCL6: si dispensa 800 µL di BOND Hybridization solution, e 100 µL di 3q27 proximal (green) e 100 µL di 3q27 distal (red). La quantità totale da preparare sarà in relazione alla quantità di vetrini da processare considerando che lo strumento dispensa circa 220µL di soluzione a test.

Preparazione dell'enzima: diluire 1:300, si prepara una soluzione totale di 3 mL costituita da 2990 µL di BOND Enzyme Diluent e 10µL di BOND Enzyme Concentrate (proteinasasi K).

Le soluzioni preparate vengono inserite in supporti (Bond Tritation Containers) che verranno riconosciuti dallo strumento in maniera univoca associando ad ogni kit la sonda preparata e l'enzima di digestione. I contenitori vengono inseriti in un kit necessario per l'allestimento del protocollo definito FISH BOND KIT destinato all'uso con sonde di acido nucleico su tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE). Il kit consiste in una miscela di formammide che riduce l'ibridazione aspecifica delle sonde di acido nucleico, utile per la fase di stringenza post-ibridazione.

Una volta avvenuto il riconoscimento del kit con le sonde e l'enzima preparati, si procede al caricamento dei casi da processare sul software associando ad ogni vetrino il test da effettuare. Il protocollo per l'analisi di MYC, BCL2 e BCL6 è stato validato all'interno della SOD di Anatomia Patologica considerando la tipologia di materiale, il tipo di fissazione e processazione dei campioni istologici. Dunque, quando si associa il test ad ogni vetrino andiamo a selezionare un protocollo già validato e preimpostato relativo ad ogni sonda.

In seguito, si possono preparare i vetrini e stampare le etichette associate ad ogni caso.

Per la preparazione dei vetrini è opportuno sottolineare che si utilizzano soltanto vetrini in vetro della giusta dimensione sui moduli di processazione BOND. Vetrini della dimensione sbagliata potrebbero non inserirsi adeguatamente nel vassoio di supporto e le Convertile potrebbero non posizionarsi appropriatamente su di essi. Entrambi i fattori possono condizionare la qualità del preparato. Le convertile sono coperture in plastica trasparente che vengono messe sopra i vetrini durante

tutta la seduta di analisi; riducendo al minimo il quantitativo di reagente necessario e proteggono i vetrini dall'essiccamento. Il supporto si inserisce all'interno dello strumento che mediante lettura ottica delle etichette assocerà ad ogni vetrino il protocollo MYC, BCL2 o BCL6 da effettuare su ogni sezione. Le fasi successive si svolgono interamente nello strumento, quando il vassoio arriva all'estremità della piattaforma deve innestare il sistema di interblocco, il LED diventa verde ad indicare che il vassoio è in posizione. Una volta avviato il ciclo, nel software si può seguire lo stato della colorazione di ogni caso e verificare se mancano o non sono sufficienti alcuni reagenti per la processazione. Una volta posizionati i vetrini verrà impostata l'ora di inizio del processo considerando che l'analisi consiste in un'ibridazione overnight e dunque il processo prevede una durata totale di 15 ore circa.

La prima fase del processo che avviene all'interno del sistema BOND è quella di sparaffinatura e asciugatura: le sezioni di tessuto incluse in paraffina devono innanzitutto essere sparaffinate e reidratate. La paraffina viene rimossa mediante BOND Dewax solution e le sezioni vengono reidratate. Prima della rimozione di paraffina il sistema BOND può riscaldare il tessuto per aumentare l'adesione al vetrino, in quanto il supporto su cui vengono inseriti i vetrini è costituito da piastre termoriscaldate. Il riconoscimento degli epitopi<sup>65,66</sup> si può ottenere mediante trattamento con calore, pretrattamento enzimatico o per mezzo di una combinazione di entrambi. Il riscaldamento della sezione a una temperatura piuttosto elevata è in grado di idrolizzare i legami crociati che si sono formati nella fissazione in formalina. Il pretrattamento enzimatico utilizza enzimi proteolitici come la pepsina per rompere i legami peptidici ed esporre

l'epitopo o la sequenza di acidi nucleici bersaglio. Una volta terminata la fase del pretrattamento enzimatico il DNA ormai smascherato viene messo a contatto con una "sonda specifica" all'interno dello strumento, la cui sequenza è complementare al segmento cromosomico che interessa evidenziare. Questa sonda "riconosce" se presente, il frammento complementare, si lega a quel segmento e si fa a sua volta riconoscere perché "marcata" da una molecola indicatrice, fluorocromo. Dopo l'ibridazione e i successivi lavaggi di stringenza il giorno successivo dopo l'incubazione overnight si procede alla disidratazione dei vetrini previa rimozione del convertile dal vetrino.

La procedura di disidratazione è manuale, i vetrini vengono immersi prima in alcol 70° poi in alcol 96° ed infine in etanolo assoluto. Questi passaggi vengono effettuati con un intervallo di circa 1-2 minuti tra un alcol e l'altro. Una volta effettuata anche la disidratazione, si procede all'asciugatura al buio. Una volta ben asciugate si procede alla selezione dell'area in base alle indicazioni del patologo; dunque, l'operatore tecnico procede a selezionare manualmente nel vetrino la porzione di sezione da analizzare e il resto viene rimosso aiutandosi con un bastoncino cotonato imbevuto di acqua. Questa fase è molto importante e delicata in quanto bisogna fare attenzione nell'individuare sulla sezione la giusta area selezionata e delicatamente rimuovere tutta la zona di non interesse. Si procede poi con il montaggio e l'utilizzo di un colorante di contrasto il diamidinofenilindolo diidrocloreuro (DAPI) da aggiungere sopra il vetrino con copri oggetto. La quantità di colorante di contrasto può variare in base alla dimensione della sezione, vengono dispensati generalmente 8µl per ogni sezione per un copri oggetto 22x22 mm, 5µl per ogni sezione per un copri oggetto 18x18 mm. Dopo il montaggio si

procede all'osservazione in fluorescenza. I vetrini vengono conservati al buio a -20 °C e restano analizzabili per circa un mese.

#### 4.2.4 Lettura ed interpretazione del segnale

L'osservazione al microscopio a fluorescenza viene effettuata per mezzo di un sistema di lettura e scansione delle immagini manuale, *Cytovision*, fornito dalla ditta Leica. Il sistema prevede l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza collegato con una telecamera che consente la scansione dei preparati. Una volta eseguita l'acquisizione e scansione delle immagini con ingrandimento 63x o 100x il software *Cytovision* consente l'analisi delle immagini mediante l'utilizzo di algoritmi predefiniti.

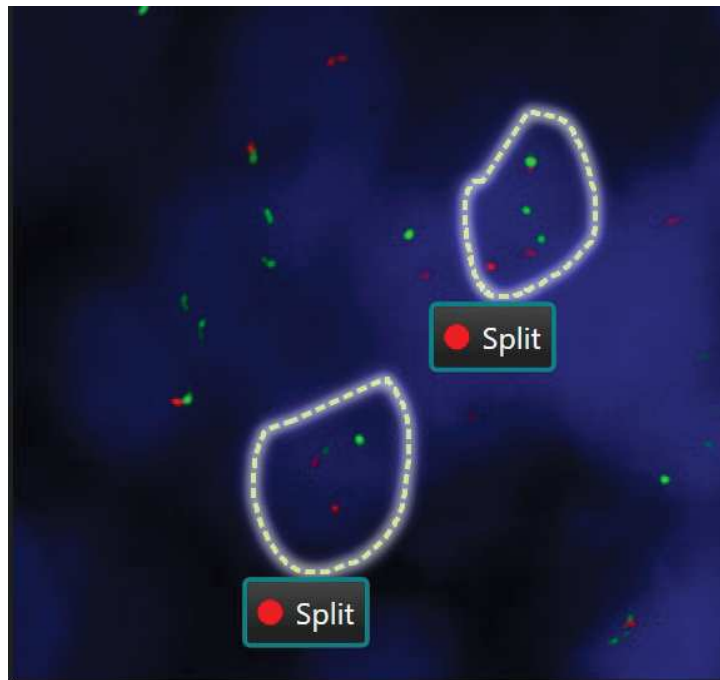


La lettura dei preparati fish avviene con un ingrandimento a 10x con filtro DAPI a 412 nm per valutare l'area della sezione istologica e la qualità del preparato. Successivamente si procede, sempre con filtro dapi, a 63x (a immersione con olio) per valutare

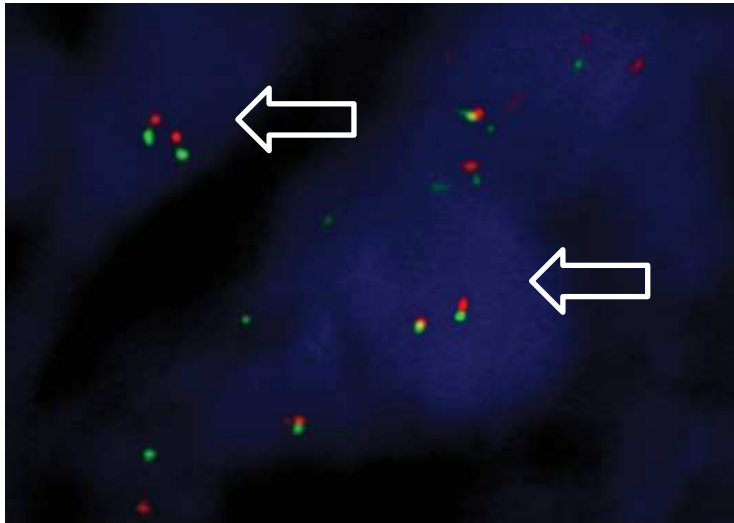


il preparato in termini di integrità del nucleo e adeguatezza della gestione enzimatica. Si procede a valutare il preparato con filtro green o orange per valutare l'eventuale presenza di segnali fusi o traslocati. Una volta analizzata tutta l'area si collega la telecamera al software e si procede ad avviare la scansione dell'immagine. Quest'ultima viene acquisita su sette piani ad una distanza di 0,7  $\mu\text{m}$  lungo il piano di riferimento Z. Il segnale viene individuato spostandosi con il cursore su ogni cellula e mediante un algoritmo, si stabilisce se le cellule presentano la traslocazione sul gene investigato. L'immagine deve essere scelta considerando nuclei ben conservati, non sovrapposti, nuclei ben visibili non coperti da componenti proteiche talvolta presenti nel preparato istologico che presentano un elevato grado di autofluorescenza, rendendo difficile l'acquisizione della scansione di immagine. Inoltre, si devono evitare aree dove il sovraffollamento nucleare non ha consentito un'ibridazione della sonda specifica. Se due segnali dello stesso colore si toccano o la distanza tra di loro non è maggiore di due larghezze di segnale, o quando vi è un filamento debole che connette i due segnali è necessario considerarlo come un unico segnale. In una cellula normale, troveremmo due segnali fusi, ognuno con un green e un orange, la vicinanza dei due tratti di sonda (verde+rosso) emetterà una colorazione gialla. In una cellula anormale, con traslocazione, il modello di segnale atteso sarà uno rosso, uno verde e eventualmente un segnale di fusione. Una volta identificati e acquisiti almeno 100 nuclei il software fornisce un resoconto finale con delle percentuali che riguardano sia cellule traslocate che non riarrangiate. In base al cut-off interno del laboratorio, nel nostro caso  $>10\%$  di cellule traslocate, si stabilisce se il paziente presenta una traslocazione significativa nel materiale analizzato. Qui di seguito mostriamo alcune possibilità

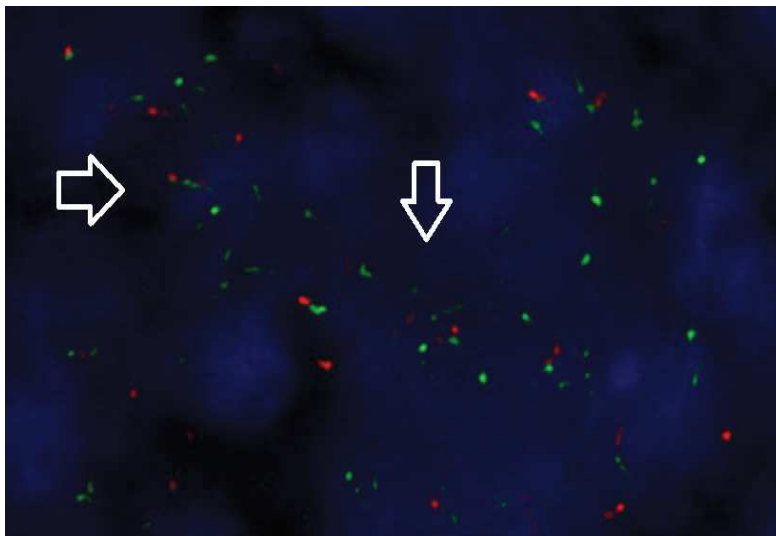
di immagini che si possono verificare durante una scansione del preparato con la rispettiva interpretazione di lettura.



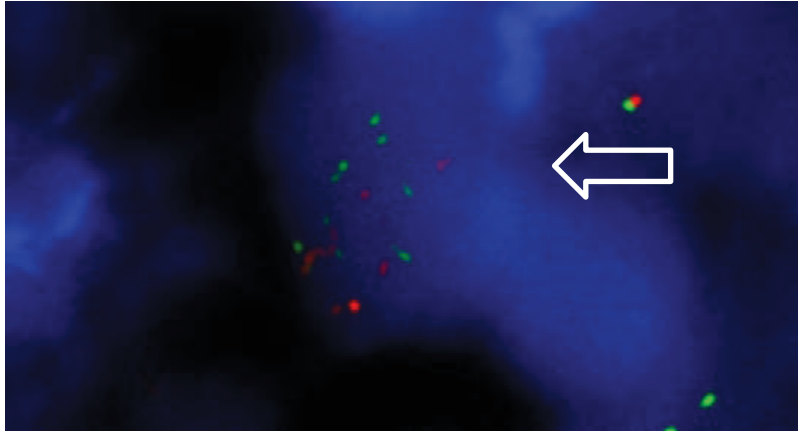
*Nella foto soprastante le due cellule evidenziate sono traslocate in quanto è possibile vedere segnali rossi e verdi sono singoli.*



*In questa immagine sono ben evidenti due cellule normali, il segnale è costituito da due segnali verdi e rossi uniti (segnali fusi).*



*Nell'immagine come mostrato anche dalle frecce ci sono dei nuclei dove l'ibridazione non è avvenuta correttamente, questo implica la presenza di un segnale trascinato. Tale area non può essere considerata idonea per la validità della seduta analitica.*



*Nell'immagine è possibile vedere un sovraffollamento cellulare che non consente di distinguere i segnali. Quest'area non può essere considerata idonea per la lettura e interpretazione del preparato.*

CASO	SESSO	PROVENIENZA	ETA'	SEDE DEL PRELIEVO
1	M	Modena	90	Ansa ileale
2	F	Reggio emilia	82	Nasofaringe
3	F	Terni	86	Retto
4	F	Terni	92	rinofaringe
5	F	Reggio Emilia	92	bocca
6	M	Reggio Emilia	90	linfonodo
7	F	Genova	84	linfonodo retroperitoneale
8	F	Genova	91	Linfonodo sovraclaveare
9	M	Genova	80	Nodulo lobo inferiore dx
10	M	Genova	86	linfonodo inguinale
11	F	Milano	94	Linfonodo crurale sx
12	M	Milano	80	Parenchima epatico
13	F	Milano	84	Linfonodo cervicale
14	M	Milano	82	Ileo
15	F	Vicenza	87	Linfonodo
16	M	Campus biomedico	92	Linfonodo retroperitoneale
17	F	Campus biomedico	85	linfonodo inguinale dx
18	F	Campus biomedico	83	linfonodo
19	F	Vicenza	80	Ascella destra
20	M	Vicenza	80	BOM
21	F	Rimini	89	Linfonodo laterocervicale sx
22	M	Brescia	93	Linfonodo sovraclaveare sx
23	M	Brescia	89	Pancreas
24	M	Brescia	92	Massa solida funicolo sx
25	F	Brescia	91	Linfonodo sovraclaveare sx
26	M	Brescia	84	Surrene dx
27	M	Brescia	88	Linfonodo ascellare dx
28	M	Piacenza	85	Adenopatia laterocervicale dx
29	F	Piacenza	86	Adenopatia fossa iliaca sx
30	M	Terni	83	Addome

### *4.3 Risultati*

Le tabelle sottostanti consentono un riepilogo dei campioni analizzati. Nella prima tabella mostriamo i dati relativi a ciascun materiale analizzato ovvero, sesso, data di nascita, centro di provenienza e sede del prelievo. I centri di provenienza maggiore sono Reggio Emilia, Rimini, Ospedale Niguarda di Milano, Vicenza, Genova, Padova, Brescia e Campus Biomedico di Roma. Le sedi anatomiche dove è stata effettuata la biopsia sono addome, bocca, nasofaringee, linfonodi della testa e del collo, testa pancreatico e duodeno, surrene, nodulo polmonare e una BOM. Nella seconda tabella un riepilogo dei risultati ottenuti nell'indagine molecolare FISH: negativo sta ad indicare che non è stata rilevata alcuna traslocazione genica a carico dei geni investigati. Triple/double invece hanno il seguente significato: double hit intende la doppia traslocazione dove certamente una traslocazione sarà a carico di MYC e l'altra su BCL2 e BCL6 ; triple hit quando invece la traslocazione è a carico di tutti e tre i geni; con una percentuale di riarrangiamento più o meno elevata. Su un totale di 30 casi di linfomi diffusi a grandi cellule B sono stati rilevati n. 5 double hit e n. 6 casi triple hit e n.16 negativi, n. 1 caso con unica traslocazione di BCL2 e n. 2 casi con traslocazione BCL6.

CASI	DATO FINALE	CMYC	BCL6	BCL2
1	Double Hit	14%	78.4%	8%
2	Triple Hit	13%	40%	24,5%
3	Triple Hit	13%	45%	43%
4	Negativo	5%	9%	4%
5	Triple Hit	67,6%	34%	12%
6	Double Hit	23,1%	85,1%	3%
7	Double Hit	81%	84%	6%
8	Negativo	0%	14%	97%
9	Negativo	3%	8%	2%
10	Triple Hit	25%	16%	37%
11	Triple Hit	16%	19%	75%
12	Double Hit	78%	8%	16%
13	Negativo	0%	8%	2%
14	Negativo	2%	9%	4%
15	Negativo	1%	0%	0%
16	Negativo	2%	5%	3%
17	Negativo	1%	0%	0%
18	Triple Hit	32%	15%	16%
19	Negativo	2%	82%	5%
20	Negativo	2%	6%	4%
21	Negativo	5%	4%	6%
22	Negativo	1%	2%	2%

CASI	DATO FINALE	CMYC	BCL6	BCL2
23	Negativo	3%	8%	7%
24	Double hit	13%	19%	4%
25	Negativo	1%	2%	5%
26	Negativo	4%	9%	7%
27	Negativo	0%	5%	0%
28	Negativo	0%	53%	0%
29	Negativo	4%	9%	9%
30	Negativo	3%	0%	2%

#### 4.3.1 Discussione dei dati

Dai risultati ottenuti con lo studio dei trenta campioni possiamo constatare che il numero di casi traslocati che presentano una traslocazione su tutti i geni investigati (triple-hit) sono intorno al 20%, mentre quelli con doppia traslocazione ovvero che coinvolge come primo gene MYC e BCL2 o BCL6 è intorno al 16%. L'età media dei pazienti che hanno presentato un assetto



genico TH e DH è sovrapponibile pari rispettivamente a 87 anni. Considerando la media di età della nostra casistica pari a 83 anni, e la media di età dei casi senza traslocazioni pari a 86; possiamo notare che le traslocazioni si sono riscontrate senza alcuna significativa variazione nella popolazione in termini di fasce di età predisposte alla manifestazione di anomalie cromosomiche. Più del 50% dei campioni non hanno mostrato traslocazioni, oppure traslocazioni singole solo di BCL2 o BCL6 dove per l'algoritmo definito dalla Linee guida AIOM non sono da considerare linfomi di alto grado B perché in prima istanza dobbiamo identificare una traslocazione che coinvolge il gene MYC. La proporzione di HGBL-DH/TH tra i tumori con morfologia del linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) è stimata tra l'1% e il 12%.<sup>73-77</sup> Nella nostra ristretta coorte di pazienti abbiamo ottenuto delle percentuali relativamente più alte rispetto a degli studi come sopra citati che coinvolgono un numero molto più alto di campioni. Inoltre, negli studi consultati dichiarano di aver utilizzato sonde MYC break-apart (DAKO) che non riescono a rilevare una proporzione di rotture cromosomiche telomeriche al gene MYC<sup>78</sup>, questo per sottolineare quanto sia importante il confronto di dati analitico-sperimentali basato sull'uso degli stessi strumenti e sonde perché i risultati ottenuti talvolta possono avere una differente specificità e sensibilità analitica. Allo stesso tempo ricordiamo che l'uso di sonde break-apart utilizzate nel nostro studio hanno un limite ovvero possono perdere una piccola percentuale (<5% [James R. Cook, Cleveland Clinic, e-mail, 25 gennaio 2018]) di riarrangiamenti MYC rilevabili solo utilizzando saggi di doppia fusione MYC / IGH.<sup>79-81</sup>

La presenza di *MYC* il riarrangiamento in DLBCL è stato associato a una prognosi sfavorevole ed è un predittore indipendente di OS abbreviato nell'era del trattamento R-CHOP. I double-hit identificati mostrano che in 4 casi su 5 è coinvolta la traslocazione di *MYC* e *BCL6*, da due ampi studi indipendenti si è dimostrato che le traslocazioni concomitanti di *MYC* e *BCL6* non sono associate a un outcome peggiore nel linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL).<sup>82-83</sup>

Il riarrangiamento del gene *BCL6* è la traslocazione cromosomica più comune identificata nel DLBCL, che si verifica nel 30-35% dei casi.<sup>92-97</sup>

Diversi studi che hanno indagato il significato prognostico del riarrangiamento di *BCL6* in DLBCL hanno prodotto risultati contrastanti, che probabilmente riflettono l'eterogeneità della malattia e le varie tecniche molecolari utilizzate. Ad esempio, il riarrangiamento di *BCL6* è stato associato a una prognosi favorevole nei pazienti con DLBCL trattati con chemioterapia simile a CHOP in alcuni studi, ma non in altri.<sup>93-97</sup>

Solo un caso è risultato double-hit con traslocazione di *MYC* e *BCL2*, e da numerosi studi la coespressione delle proteine *MYC* e *BCL2* in DLBCL, non definisce una specifica biologia del tumore, ma piuttosto dovrebbe essere considerata un biomarcatore prognostico di un esito sfavorevole. Questa è stata una scoperta coerente in 8 studi<sup>83-91</sup>, a sostegno dei dati preclinici che mostrano questa doppia traslocazione presentano linfomi con prognosi sfavorevole e resistenza alla chemioterapia multiagente, anche se trattati con R-CHOP o regimi di trattamento ad alta intensità. Questo scarso risultato è probabilmente correlato all'azione sinergica della promozione della crescita indotta da

MYC e all'effetto antiapoptotico fornito da *BCL2*. Un campione presenta una traslocazione molto alta in termini di percentuale di *BCL2* pari al 97% e pari al 14% per *BCL6* senza alcuna traslocazione a carico del gene *MYC*; in questo caso una spiegazione che possiamo darci è quella che il punto di rottura del gene *MYC* probabilmente non è coperto dalle sonde break-apart utilizzate, sarebbe interessante testare il campioni con sonde dual fusion. Analogamente per altri due casi abbiamo individuato solo un riarrangiamento a carico del gene *BCL6* non sufficiente per poter definire i linfomi come double expressor. Dai nostri risultati si evince come vi sia una percentuale significativa di DLBCL che presentano traslocazioni a carico dei geni *MYC*, *BCL2* e/o *BCL6*. Dunque, è importante identificare tali casi con tecniche molecolari, nel particolare si potrebbe valutare in primis la presenza di anomalia a carico del gene *MYC* utilizzando FISH, soprattutto se l'indice di proliferazione è >80%. Inoltre, la determinazione dei riarrangiamenti di *BCL2* e *BCL6* è indispensabile anche per identificare il linfoma DH/TH, che hanno un comportamento clinicamente più aggressivo e una prognosi estremamente sfavorevole. I pazienti con queste anomalie hanno una scarsa risposta a R-CHOP e per questi casi dovrebbero essere sviluppati nuovi approcci terapeutici. I risultati dello studio mostrano come sia necessario eseguire di routine nei laboratorio diagnostico clinici questa tecnica di ibridazione in situ a fluorescenza in quanto dai risultati ottenuti è possibile definire, oltre ad una caratterizzazione biologica del linfoma, consente di identificare riarrangiamenti di *MYC* e *BCL2* e/o *BCL6* e dunque classificare il tumore come un linfoma a cellule B di alto grado (HGBL), il quale è associato a una prognosi sfavorevole e a una scarsa risposta alla chemio-immunoterapia standard (rituximab,

ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone; RCHOP) e una sopravvivenza limitata rispetto a quelli senza HGBL-DH/TH, suggerendo la raccomandazione di un trattamento più intensivo approcci in questa impostazione<sup>70-72</sup>. Infatti, la prognosi sfavorevole e gli esiti avversi dopo la chemio immunoterapia standard per i pazienti con linfomi a cellule B di alto grado che ospitano riarrangiamenti di *MYC* e *BCL2* e/o *BCL6* (HGBL-DH/TH) è ormai consolidato, con una sopravvivenza a lungo termine stimata inferiore al 20% dopo le terapie standard. Il paradosso di una prognosi estremamente sfavorevole unita a una frequenza relativamente insolita, solleva la sfida pratica di determinare quale paziente richiede il test FISH ed è un'area di controversie sostanziali e dati emergenti. La conseguenza clinica della mancanza di HGBL-DH/TH è terribile, poiché questi pazienti sono probabilmente sotto trattati dalla chemio immunoterapia standard (RCHOP).

## CONCLUSIONI

L'estrema eterogeneità genetica dei linfomi diffusi a grandi cellule B è strettamente correlata a profonde alterazioni dell'assetto cromosomico, che comprendono sia anomalie di numero sia strutturali. Poiché non è possibile identificare un fenotipo clinico distinto o una morfologia patologica per prevedere con precisione DLBCL-DH/TH, la tecnica di ibridazione in situ fluorescente (FISH) riveste un ruolo importante nella caratterizzazione molecolare di questo sottogruppo di linfomi. Sulla base di questi dati, questo è il metodo più sensibile nella pratica di laboratorio per diagnosticare i pazienti con HGBL-DH/TH. Risulta chiaro che identificare questi pazienti è fondamentale per cambiare la gestione clinica e terapeutica del paziente. Ciò rappresenta una sfida per i centri che potrebbero non essere pronti a gestire il carico di lavoro aggiuntivo e l'onere finanziario associato all'aumento delle richieste di test FISH.

## BIBLIOGRAFIA

1. Campo E et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011.
2. Alizadeh AA, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000; 403:503–511. [PubMed: 10676951]
3. Martelli M, Ferreri AJM, Agostinelli C, et al. Diffuse large B-cell lymphoma. *CritRevOncolHematol*. 2013;87(2):146-71. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2012.12.009
4. Dati registro tumori 2000-2003, [www.registro-tumori.it](http://www.registro-tumori.it)
5. Luminari S, Cesaretti M, Rashid I, et al : incidence, clinical characteristics and survival of malignant lymphomas: a population-based study from a cancer registry in northern Italy. *Hematol Oncol* 25:189-97,2007.
6. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, et al : Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in United States , 1992-2001. *Blood* 107:265-276,2006
7. Freedman AS, Friedberg JW. Patient education: diffuse large B-cell lymphoma in adults (Beyond the Basics). Up To Date. Updated July 22, 2022. Accessed August 20, 2022.
8. Non-Hodgkin lymphoma risk factors. *American Cancer Society*. Accessed August 20, 2022.
9. Burkitt lymphoma. Cancer Research UK. Accessed August 20, 2022.
10. Narkhede M, Arora S, Ujjani C. Primary effusion lymphoma: current perspectives. *Onco Targets Ther*. 2018;11:3747-3754. doi:10.2147/OTT.S167392
11. Burkitt lymphoma. Cancer Research UK. Accessed August 20, 2022.
12. Narkhede M, Arora S, Ujjani C. Primary effusion lymphoma: current perspectives. *Onco Targets Ther*. 2018;11:3747-3754. doi:10.2147/OTT.S167392
13. Rohrmann S, Becker N, Linseisen J, et al. Fruit and vegetable consumption and lymphoma risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control*. 2007;18(5):537-549. doi:10.1007/s10552-007-0125-z
14. Chen GC, Lv DB, Pang Z, Liu QF. Fruits and vegetables consumption and risk of non - Hodgkin's lymphoma: a meta-analysis of observational studies. *Int J Cancer*. 2013;133(1):190-200. doi:10.1002/ijc.27992

15. Kelemen LE, Cerhan JR, Lim U, et al. Vegetables, fruit, and antioxidant-related nutrients and risk of non-Hodgkin lymphoma: a National Cancer Institute–Surveillance, Epidemiology, and End Results population-based case-control study. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(6):1401-1410. doi:10.1093/ajcn/83.6.1401
16. Linee guida AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica), *Linfomi* Edizione 2018
17. López-Guillermo A, Colomo L, Jiménez M, et al. Diffuse large B-cell lymphoma: clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J Clin Oncol.* 2005;23(12):2797-2804. DOI: 1200/JCO.2005.07.155
18. Gouveia GR, Siqueira SAC, Pereira J. Patho physiology and molecular aspects of diffuse large B-cell lymphoma. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2012;34(6):447-451. DOI: 5581/1516-8484.20120111
19. Gurbaxani S, Anastasi J, Hyjek E. Diffuse large B-cell lymphoma—more than a diffuse collection of large B cells: an entity in search of a meaning full classification. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(7):1121-1134. DOI: 1043/1543-2165-133.7.1121.
20. Martelli M, Ferreri AJM, Agostinelli C, et al. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013;87(2):146-71. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2012.12.009.
21. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375-2390. DOI: 1182/blood-2016-01-643569.
22. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med.* 2018;24(5):679-690. DOI: 1038/s41591-018-0016-8.
23. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2018;378:1396-1407. DOI: 10.1056/NEJMoa1801445.
24. Davies A. Double-hit lymphoma: So what? *Hematol Oncol.* 2019;37(suppl 1):19-23. DOI: 1002/hon.2581.
25. Hans C.P., Weisenburger D.D., Grainer T.C, et al: Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 103:275-282,2004.
26. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127:2375–2390, 2016).

27. Swerdlow, SH; Campo, E; Harris N et al., Swerdlow E.; Harris N.L.; Jaffe E.S.; Pileri S.A.; Stein H.; Thiele J.; Vardiman J.W. SH. C: WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. (ed 4th). Lyon, France, *IARC Press*, 2008).
28. Swerdlow S.H.: Diagnosis of “double hit” diffuse large B cell lymphoma and B cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediated between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *HematologyAm. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2014:90-99,2014).
29. Padala SA. Diffuse large B cell lymphoma. *StatPearls*. Updated April 28, 2022. Accessed August 22, 2022.
30. Sammak, S. et al. Crystal Structures and Nuclear Magnetic Resonance Studies of the Apo Form of the c-MYC:MAXbHLHZip Complex Reveal a Helical Basic Region in the Absence of DNA. *Biochemistry* 58, 3144-3154 (2019).
31. Stoelzle, T., Schwarb, P., Trumpp, A. & Hynes, N. c-Myc affects mRNA translation, cell proliferation and progenitor cell function in the mammary gland. *BMC Biology* 7, 63 (2009).
32. Miller, D., Thomas, S., Islam, A., Muench, D. & Sedoris, K. c-Myc and Cancer Metabolism. *Clinical Cancer Research* 18, 5546-5553 (2012).
33. Cai et al, 2015; Nguyen L, et al 2017
34. Koh 2016
35. Petrich 2014
36. Petrich 2014
37. Chen-Levy 1989
38. Thomadaki 2006, Reed 2006
39. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. *Cell Death Dis*. 2019 Feb 21;10(3):177. doi: 10.1038/s41419-019-1407-6
40. Thomadaki 2006, Reed 2008, Aki et al BCL2 family of apoptosis related genes: Functions and clinical implications in *Cancer* 2014.
41. Thomadaki 2006, Reed 2008, Aki et al BCL2 family of apoptosis related genes: Functions and clinical implications in *Cancer* 2014.
42. Bonnefoy et al, 2004 Control of proliferation by BCL2 family members, Volume 1644 Issues 2-3.
43. Diffuse large B-cell lymphoma after transformation from low-grade follicular lymphoma: morphological, immunohistochemical, and FISH analyses. Maeshima AM, Omatsu M, Nomoto J, Maruyama D, Kim SW, Watanabe T, Kobayashi Y, Tobinai K, Matsuno Y. *Cancer Sci*. 2008 Sep;99(9):1760-8.
44. Mutation landscape of high-grade B-cell lymphoma with MYC-, BCL2 and/or BCL6 rearrangements characterized by whole-exome sequencing. Künstner A, Witte HM, Riedl J, Bernard V,



- Stölting S, Merz H, Olschewski V, Peter W, Ketzer J, Busch Y, Trojok P, Bubnoff NV, Busch H, Feller AC, Gebauer N. *Haematologica*. 2022 Aug 1;107(8):1850-1863.
45. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Schmitz R, Wright GW, Huang DW et al. *N Engl J Med*. 2018 Apr 12;378(15):1396-1407.
  46. Bakhshi A, Wright JJ, Graninger W, Seto M, Owens J, Cossman J, Jensen JP, Goldman P, Korsmeyer SJ. Mechanism of the t(14;18) chromosomal translocation: structural analysis of both derivative 14 and 18 reciprocal partners *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Apr;84(8):2396-400.
  47. Aster e Longtine: Detection of *BCL2* Rearrangements in Follicular Lymphoma, Mar 2002;160(3): 759–763.
  48. Seto 1988, Tanaka et al 1992 :C. elegans cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*.
  49. Cory et al, 2003, Yip e Reed, 2008, *Oncogene*: BCL2 family proteins and cancer; 27,6398–6406 (2008).
  50. Phan et al., 2004:The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells; *Nature*, 432,635-639(2004).
  51. revisioni in Albagli-Curiel, 2003; Jardin et al., 2007; Parekh et al., 2008; Basso e Dalla-Favera, 2010; Pellicano e Holyoake, 2011; Wagner et al. , 2011; Basso e Dalla-Favera, 2012; *Okada* et al., 2012.
  52. Pasqualucci L. et al., 2003, Mutations of the *BCL6* proto-oncogene disrupts negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* (2003) 101 (8): 2914–2923
  53. Saito et al., 2007, A Signaling Pathway Mediating Down regulation of *BCL6* in Germinal Center B Cells Is Blocked by *BCL6* Gene Alterations in B Cell Lymphoma.
  54. Akyurek et al., 2012, Analysis of MYC gene rearrangement along with BCL2 and BCL6 is critical in identifying high-risk patients with poor prognosis. *Cancer* 2012. © 2011 American Cancer Society.
  55. Kearney L. L'impatto delle nuove tecnologie ittiche sulla citogenetica delle neoplasie ematologiche. *Br J Haematol*. 1999; 104 :648–658.;
  56. Gozzetti A, Le Beau MM. Ibridazione fluorescente in situ: usi e limiti. *Semina Hematol*. 2000; 37 : 320-333.
  57. Cuoco JR. Ibridazione in situ della fluorescenza interfascia della sezione di paraffina nella diagnosi e classificazione dei linfomi non Hodgkin. *Diagnosi Mol Pathol*. 2004; 13 :197–206.;
  58. Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R. Citogenetica interfascia delle neoplasie ematologiche nella

- prospettiva della nuova classificazione dell'OMS. *Ricerca antitumorale*. 2003; 23 :1139-1148.
59. Li JY, Gaillard F, Moreau A, Harousseau JL, Laboisce C, Milpied N, Bataille R, Avet-Loiseau H. Rilevazione della traslocazione t(11;14) (q13;q32) nel linfoma a cellule del mantello mediante fluorescenza in ibridazione in situ. *Sono J Pathol*. 1999; 154 : 1449-1452.;
  60. Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I, Bailey RJ, Proffitt J, Wyatt WA, Hanson CA, Dewald GW. Utilità diagnostica dell'ibridazione in situ fluorescente nel linfoma mantellare. *Br J Haematol*. 2000; 110 :856–862.)
  61. Taji S, Nomura K, Matsumoto Y, Sakabe H, Yoshida N, Mitsufuji S, Nishida K, Horiike S, Nakamura S, Morita M, Taniwaki M. Trisomy 3 possono prevedere una scarsa risposta del linfoma MALT gastrico alla terapia di eradicazione dell'*Helicobacter pylori*. *Mondo J Gastroenterol*. 2005; 11 :89–93.;
  62. Aubele M, Zitzelsberger H, Szucs S, Werner M, Braselmann H, Hutzler P, Rodenacker K, Lehmann L, Minkus G, Hofler H. Analisi FISH comparativa delle anomalie numeriche del cromosoma 7 nel tessuto incluso in paraffina da 5 micron e 15 micron sezioni di carcinoma prostatico. *Cellula istochimica Biol*. 1997; 107 :121–126. ;
  63. D'Alessandro I, Zitzelsberger H, Hutzler P, Lehmann L, Braselmann H, Chimenti S, Hofler H. Aberrazioni numeriche del cromosoma 7 rilevate in sezioni di tessuto incluse in paraffina da 15 micron di melanomi cutanei primari mediante ibridazione in situ fluorescente e scansione laser confocale microscopia. *J CutanPathol*. 1997; 24 :70–75.
  64. rivisto da Srinivason et al. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effetto dei fissativi e dell'elaborazione dei tessuti sul contenuto e sull'integrità degli acidi nucleici. *Sono J Pathol*. 2002; 161 : 1961–1971.)
  65. Shi SR, Gu S and Taylor CR Antigen retrieval Techniques: Immunochemistry and Molecular Morphology. Eato in *Publishing*,2000.
  66. Miller RT, Swanson PE and Wick MR. Fixation and epitope Retrieval in diagnostic immunochemistry: a concise review with practical considerations. *Appl Immunochemistry Morphol*,2000 ; 8(3):228-35.
  67. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35297566/HarukaIkoma, MasashiMiyaoaka, ShinichiroHiraiwa, et al.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35297566/HarukaIkoma,MasashiMiyaoaka,ShinichiroHiraiwa,et%20al)
  68. Frosch Z AK, Nasta SD, Schuster SJ, et al. Outcomes for double hit lymphoma patients identified via routine vs selective testing for

- MYC rearrangement. *ASH Meeting*, Orlando 7-10 2019; abstract n°607.
69. Laura Bonaldi, Immunologia e Diagnostica Molecolare Oncologica. Istituto Oncologico VENETO-IRCCS, Padova
  70. Swerdlow, SH, Campo, E, Harris, NL, Jaffe, ES, Pileri SA, Stein, H, et al. Classificazione OMS dei tumori dei tessuti ematopoietici e linfoidi , rivista 4a edn. *Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro*: Lione, Francia, 2017.
  71. Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, Castillo JJ, Rajguru S, Yang DT, et al. Impatto del regime di induzione e del trapianto di cellule staminali sugli esiti nel linfoma a doppio colpo: un'analisi retrospettiva multicentrica. *Sangue*. 2014;
  72. Rosenwald A, Bens S, Advani R, Barrans S, Copie-Bergman C, Elsensohn MH, et al. Significato prognostico del riarrangiamento di MYC e partner di traslocazione nel linfoma diffuso a grandi cellule B: uno studio del Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J ClinOncol*. 2019.
  73. Obermann EC, Csato M, Dirnhofer S, Tzankov A. Aberrations of the MYC gene in unselected cases of diffuse large B-cell lymphoma are rare and unpredictable by morphological or immunohistochemical assessment. *J ClinPathol*. 2009;62(8):754-756.
  74. Ye Q, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al.. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 2016;7(3):2401-2416.
  75. Pedersen MO, Gang AO, Poulsen TS, et al.. MYC translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with MYC- or double-hit MYC/BCL2 translocations. *Eur J Haematol*. 2014;92(1):42-48.
  76. Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, et al.. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood*. 2015;126(22):2466-2474.
  77. Barrans S, Crouch S, Smith A, et al.. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. *J ClinOncol*. 2010;28(20):3360-3365.
  78. Muñoz-Mármol AM, Sanz C, Tapia G, Marginet R, Ariza A, Mate JL. MYC status determination in aggressive B-cell lymphoma: the impact of FISH probe selection. *Histopathology*. 2013;63(3):418-424.
  79. Tzankov A, Xu-Monette ZY, Gerhard M, et al.. Rearrangements of MYC gene facilitate risk stratification in diffuse large B-cell

- lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol*. 2014;27(7):958-971.
80. Muñoz-Mármol AM, Sanz C, Tapia G, Marginet R, Ariza A, Mate JL. MYC status determination in aggressive B-cell lymphoma: the impact of FISH probe selection. *Histopathology*. 2013;63(3):418-424.
  81. May PC, Foot N, Dunn R, Geoghegan H, Neat MJ. Detection of cryptic and variant IGH-MYC rearrangements in high-grade non-Hodgkin's lymphoma by fluorescence in situ hybridization: implications for cytogenetic testing. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;198(1):71-75.
  82. Q Ye, ZY Xu-Monette, A Tzankov, et al. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma, *Oncotarget*, 7 (3) (2016), pp. 2401-2416.
  83. C Copie-Bergman, P Cuillière-Dartigues, M Baia, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study; *Blood*, 126 (22) (2015), pp. 2466-2474.
  84. Q Ye, ZY Xu- Monette, A Tzankov, et al. Prognostic impact of concurrent MYC and BCL6 rearrangements and expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma *Oncotarget*, 7 (3) (2016), pp. 2401-2416
  85. NA Johnson, GW Slack, KJ Savage, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone *J Clin Oncol*, 30 (28) (2012), pp. 3452-3459
  86. TM Green, KH Young, C Visco, et al. Immunohistochemical double-hit score is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone *J Clin Oncol*, 30 (28) (2012), pp. 3460-3467
  87. S Hu, ZY Xu-Monette, A Tzankov, et al. MYC/BCL2 protein coexpression contributes to the inferior survival of activated B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates high-risk gene expression signatures: a report from The International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program *Blood*, 121 (20) (2013), pp. 4021-4031
  88. LX Yan, YH Liu, DL Luo, et al. MYC expression in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma not otherwise specified *PLoS One*, 9 (8) (2014), p. e104068
  89. H Horn, M Ziepert, C Becher, et al., German High-Grade Non-Hodgkin Lymphoma Study Group MYC status in concert with

- BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma *Blood*, 121 (12) (2013), pp. 2253-2263
90. AM Perry, Y Alvarado-Bernal, JA Laurini, et al. MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab *Br Haematol*, 165 (3) (2014), pp. 382-391
  91. H Takahashi, K Miura, M Nakagawa, et al. Negative impact of concurrent overexpression of MYC and BCL2 in patients with advanced diffuse large B-cell lymphoma treated with dose-intensified immunochemotherapy *Leuk Lymphoma*, 57 (12) (2016), pp. 2784-2790
  92. Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, et al. Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA Study. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 5573- 5579.
  93. Offit K, Lo Coco F, Louie DC, et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1994; 331: 74- 80.
  94. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1998; 92: 3152- 3162.
  95. Barrans SL, O'Connor SJ, Evans PA, et al. Rearrangement of the BCL6 locus at 3q27 is an independent poor prognostic factor in nodal diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2002; 117: 322- 332.
  96. Tibiletti MG, Martin V, Bernasconi B, et al. BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas: a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *HumPathol*. 2009; 40: 645- 652.
  97. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007; 21: 2332- 2343.