

**1. INTRODUZIONE**

|   |    |
|---|----|
| 1.1. Immunoistochimica.....   | 2  |
| 1.2. Inquadramento dei linfomi e l'importanza diagnostica<br>dell' immunoistochimica..... | 10 |
| 1.3. I linfomi cutanei .....  | 11 |
| 1.3.1. Micosi fungoide .....  | 12 |
| 1.3.2. Sindrome di sezary.....  | 13 |
| 1.4. PON2 .....   | 14 |

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| <b>SCOPO DELLA TESI .....</b> | <b>15</b> |
|-------------------------------|-----------|

**2. MATERIALE E METODI**

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 2.1. Materiale .....                  | 16 |
| 2.2. Metodi                           |    |
| 2.2.1. Trattamenti dei campioni ..... | 16 |
| 2.3. Analisi statistica .....         | 21 |

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>3. RISULTATI .....</b> | <b>22</b> |
|---------------------------|-----------|

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| <b>DISCUSSIONE .....</b> | <b>24</b> |
|--------------------------|-----------|

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b> | <b>26</b> |
|---------------------------|-----------|

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1. IMMUNOISTOCHEMICA**

Con il termine immunoistochimica si intende l'insieme di tecniche applicate alla microscopia ottica che evidenziano specifiche molecole o strutture del compartimento intra ed extra cellulare provviste di caratteristiche antigeniche presenti nei tessuti normali o patologici, tramite l'utilizzo di anticorpi policlonali o monoclonali con elevata specificità verso tali strutture. La tecnica immunoistochimica si basa sulla reazione immunologica, cioè il legame specifico tra l'antigene(Ag) presente nel tessuto da esaminare e l'anticorpo(Ab) introdotto dall'esterno. L'avvenuta coniugazione tra Ag e Ab è evidenziata dalla presenza di una molecola marker coniugata direttamente o indirettamente all'anticorpo.

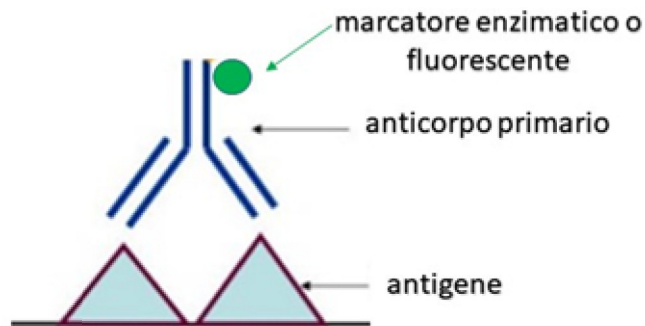
L'immunoistochimica riveste un ruolo molto importante nella routine del laboratorio di Anatomia Patologica dove viene applicata per la formulazione della diagnosi di lesioni che presentano difficoltà nell'interpretazione, con una sola analisi morfologica al microscopio ottico. In particolare, risulta utile nel campo della diagnostica istopatologica delle neoplasie poiché riesce spesso a fornire parametri orientativi sull'origine delle cellule neoplastiche.

È stata introdotta nel 1941 quando Albert Coons pensò di coniugare un anticorpo con un marcatore fluorescente, gettando così le basi dell'immunofluorescenza ed anche dell'immunoistochimica. Friou e Holborrow descrissero per la prima volta un sistema indiretto di immunofluorescenza nel 1957, mentre Ortega e Mellors impiegarono per primi la tecnica su tessuto fresco non fissato. Alla fine degli anni 50, Singer provò a coniugare gli anticorpi con molecole metalliche elettrodense per utilizzare la metodica su preparati di microscopia elettronica allo scopo di identificare strutture sub-cellulari con anticorpi marcati con ferritina (immunoultramicroscopia). Nel 1962 Sainte-Marie iniziò ad utilizzare l'immunofluorescenza su sezioni di materiale fissato in alcool e incluso in paraffina. Nel 1966 nei laboratori di Avrameas, Uriel, Nakane e Pierce, fu introdotta l'immunoistochimica enzimatica che utilizza traccianti enzimatici legati agli anticorpi con visualizzazione in microscopia tradizionale. Inizialmente, gli anticorpi erano marcati con perossidasi e utilizzati con metodi diretti e indiretti successivamente

le metodiche sono state modificate e migliorate (Leonardo E., 2011). La conservazione ottimale dell'architettura del tessuto e dell'antigene, l'uso di anticorpi appropriati, la scelta di tecniche di rivelazione specifiche sensibili sono condizioni essenziali per la reazione immunostochimica. Il processo di fissazione dei tessuti in formalina e di inclusione in paraffina possono modificare chimicamente alcuni determinanti antigenici in modo da non renderli accessibili al riconoscimento con gli anticorpi. La disponibilità di anticorpi di nuova generazione in grado di riconoscere epitopi resistenti ai processi di fissazione ed inclusione e l'uso di tecniche per smascherare siti antigenici alterati hanno permesso un notevole miglioramento delle tecniche immunostochimiche. Le metodiche di "antigen retrieval" comunemente usate, consentono la distruzione dei cross-legami introdotti dalla fissazione in formalina, consentendo così l'accessibilità di un maggior numero di epitopi agli anticorpi in uso. Lo smascheramento antigenico si basa sulla digestione enzimatica tramite enzimi proteolitici (tripsina, pepsina, proteinasi K) o sull'esposizione delle sezioni ad alte temperature (95-98°C) mediante bagno termostato, forno a microonde o pentola a pressione, in soluzioni tampone a pH variabile, come il Tampone Citrato a pH 6.0 e il Tampone Tris-EDTA a pH 9.0.

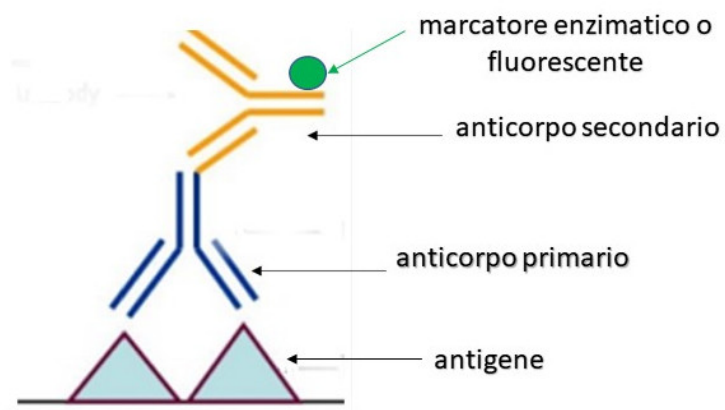
Le tecniche immunostochimiche possono avvalersi di metodi diretti ed indiretti, metodi con immunocomplessi, metodi che utilizzano il complesso avidina/biotina e metodi che si basano sulla tecnologia dei polimeri.

Nel metodo diretto, l'anticorpo specifico contro l'antigene da ricercare viene coniugato direttamente con dei marcatori che possono essere fluorocromi (fluoresceina) o enzimi (perossidasi, fosfatasi alcalina) che permettono la localizzazione del complesso antigene/anticorpo. I fluorocromi possono essere visualizzati direttamente al microscopio a fluorescenza, i marker enzimatici sono visualizzati dopo sviluppo della reazione in presenza del substrato specifico (Fig 1a).



*Fig 1a: Rappresentazione schematica del metodo diretto*

Nel metodo indiretto l'antigene da ricercare viene fatto reagire con l'anticorpo primario non coniugato specifico per l'antigene in studio; successivamente il complesso antigene-anticorpo formatosi viene evidenziato con immunoglobuline dirette contro l'anticorpo primario e coniugate ad una molecola marker (anticorpo secondario). In questo modo le molecole dell'anticorpo primario fungono, a loro volta, da antigene per le molecole dell'anticorpo secondario coniugato (Fig 1b).



*Fig 1b: Rappresentazione schematica del metodo indiretto*

Il metodo degli immunocomplessi si basa sull'incubazione sequenziale delle sezioni con tre diversi reagenti:

- L'anticorpo primario, specifico per il determinante antigenico da ricercare
- L'anticorpo "ponte" diretto contro le immunoglobuline dell'anticorpo primario
- Il complesso costituito da tre molecole di enzima (perossidasi o fosfatasi alcalina) legate immunologicamente a sandwich a due immunoglobuline della stessa specie del primario (complessi perossidasi-anti-perossidasi o PAP e fosfatasi alcalina-anti-fosfatasi alcalina o APAAP).

L'enzima marker, in presenza del substrato-cromogeno, catalizzerà la reazione con formazione di un prodotto colorato(Fig. 2). Questo metodo è di gran lunga più sensibile di altre tecniche e dà buoni risultati soprattutto sui tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina.

complesso perossidasi-anti-perossidasi

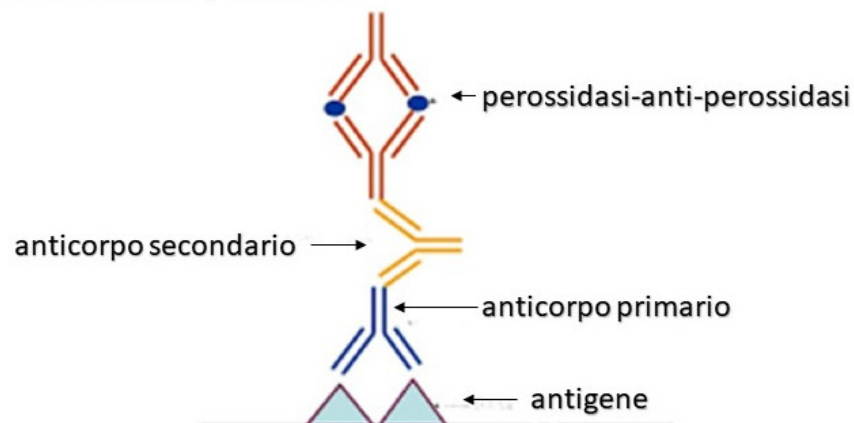


Figure 2: Rappresentazione della reazione immunoistochimica con immunocomplessi.

L'enzima di impiego routinario nelle indagini immunoistochimiche è la perossidasi di rafano (horse-radish peroxidase, HRP), una glicoproteina enzimatica di piccole dimensioni che non interferisce con il legame degli anticorpi ai siti adiacenti e si può facilmente ottenere in forma altamente purificata. La funzione della perossidasi è quella di catalizzare una reazione di ossido-riduzione tra un substrato specifico donatore di elettroni, che si ossida formando un prodotto finale di reazione colorato e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) che sarà ridotto ad acqua ( $H_2O$ ).

Ci sono numerosi cromogeni che fungono da substrato e possono agire come donatore di elettroni in questa reazione enzimatica, dando origine ad un prodotto che localizzerà l'antigene mediante la formazione di un precipitato nel punto in cui è avvenuta la reazione. Il cromogeno più usato come substrato della perossidasi è rappresentato da 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) che produce un'intensa colorazione marrone, formando un precipitato insolubile in acqua e resistente ai solventi organici come alcool e xilolo.

A differenza di altri cromogeni (3-amino-9-etil-carbazolo -AEC, 4-cloro-1-naftolo -CL-NAFT-), i vetrini colorati con la DAB, possono essere disidratati, montati secondo le tecniche di routine e conservati stabilmente a lungo senza ricorrere a particolari accorgimenti. Il principale svantaggio della DAB (derivato della benzidina) è la sua cancerogenicità, per cui occorre maneggiarla con estrema cautela, evitando l'inalazione della polvere e il contatto con la cute. Attualmente sono in commercio kit che contengono il cromogeno DAB come soluzione liquida concentrata, permettendo di ridurre al minimo il rischio di contaminazione; la soluzione di lavoro si prepara al momento dell'uso miscelando in apposito diluente poche gocce di DAB liquida concentrata. È comunque consigliato eseguire l'operazione sotto cappa, usando guanti e decontaminare gli strumenti con agenti ossidanti (ipoclorito di sodio).

La tecnica del complesso avidina-biotina rappresenta uno dei metodi recentemente più utilizzati nella colorazione immunoistochimica. Essa si basa sull'elevata affinità esistente tra queste due molecole per cui l'avidina che è una glicoproteina estratta dal bianco d'uovo, in virtù della sua struttura, è in grado di legare in maniera non immunologica, quattro molecole di biotina (vitamina H). Si tratta di una metodica a tre tappe in cui le sezioni vengono incubate in:

- un anticorpo primario specifico per l'antigene da localizzare,
- un anticorpo secondario coniugato con biotina, che si legherà all'anticorpo primario,
- un complesso ABC formato da avidina e biotina coniugata con perossidasi o fosfatasi alcalina.

Il complesso ABC si prepara 30 minuti prima dell'incubazione e i siti liberi presenti sulla molecola di avidina consentono il legame con la biotina dell'anticorpo secondario; l'enzima è visualizzato mediante incubazione con il cromogeno specifico. La possibilità di introdurre nel complesso Ag-Ab un elevato numero di molecole marker conferisce a questo metodo una sensibilità maggiore che permette anche la rilevazione di una quantità minima di antigene (Fig. 3). Lo svantaggio del metodo è dovuto al fatto che l'avidina, essendo una glicoproteina, presenta affinità per alcuni recettori del tessuto, dando luogo ad interazioni aspecifiche, che possono derivare anche dal suo punto isoelettrico di 10, per cui a pH fisiologico presenta sulla sua molecola cariche positive attratte dal tessuto.

È stato possibile ridurre i problemi di aspecificità sostituendo l'avidina con la streptavidina, molecola proteica estratta dallo *Streptomyces avidinii*, analoga alla prima per struttura ed affinità per la biotina, ma con minori problemi di legami aspecifici. La streptoavidina, è una proteina che provoca minori legami con il tessuto normale e quindi meno segnali di fondo; inoltre il suo punto isoelettrico è neutro a pH fisiologico, quindi non presenta cariche positive attratte dal tessuto come per l'avidina (Fig. 4).

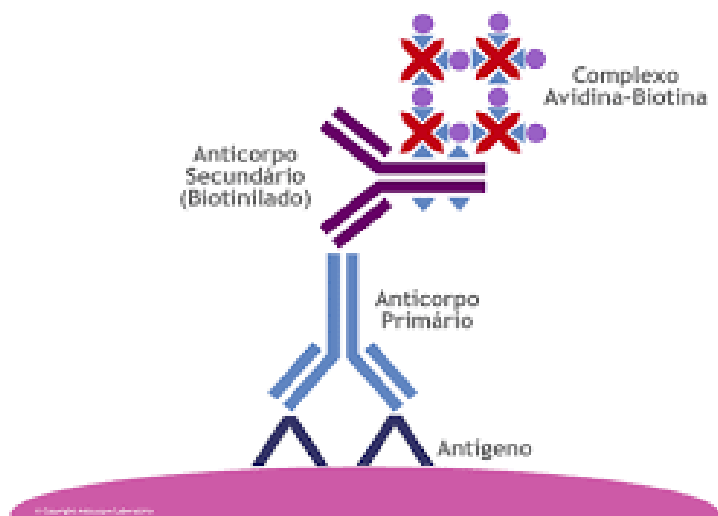


Figura 3: Rappresentazione schematica del metodo avidina-biotina

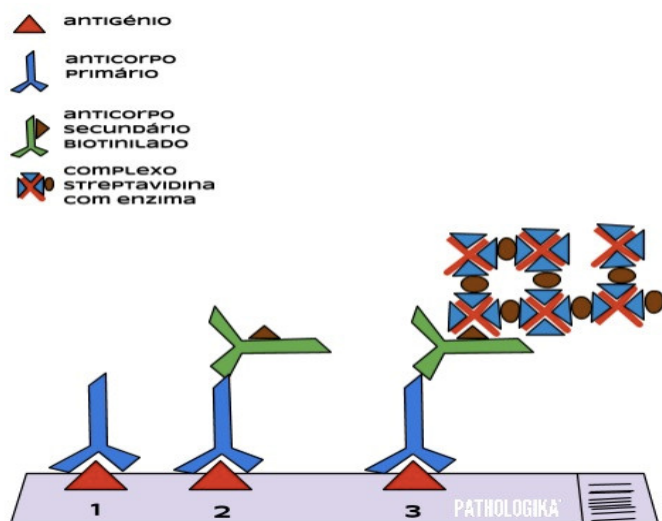


Figura 4: Rappresentazione schematica del metodo streptavidina-biotina.

Negli ultimi anni è stato messo a punto un sistema alternativo basato sull'utilizzo di strutture portanti di natura polimerica(es: molecole di destrano) alle quali sono legate numerose molecole di anticorpo secondario e molte molecole di enzima(perossidasi o fosfatasi alcalina). Questa struttura si lega ad un anticorpo primario specifico per l'antigene. Gli enzimi infine vengono fatti reagire con substrati cromogeni come la DAB. Questo metodo offre una elevata sensibilità e notevole potere di amplificazione,



permettendo di rilevare anche minime quantità di antigene presente nel tessuto; i tempi di colorazioni sono molto ridotti e le reazioni aspecifiche sono quasi nulle(Fig. 5).

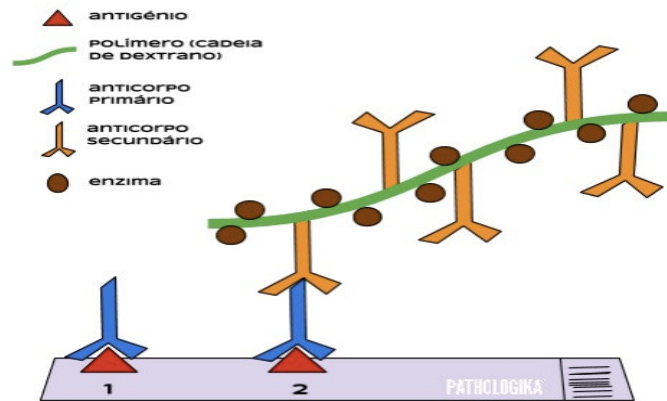


Figura 5: Rappresentazione schematica del metodo di amplificazione mediante polimeri.

Al fine di migliorare la riproducibilità, la precisione e l'accuratezza dei risultati prodotti, sono essenziali alcuni controlli delle procedure e dei reagenti in ogni tecnica di colorazione utilizzata. I parametri più importanti da valutare sono:

- controllo di attività di reagenti: si esegue periodicamente un controllo di attività dei reagenti sui tessuti già noti e precedentemente testati per verificare che la loro funzionalità si mantenga costante nel tempo.
- Controllo di specificità del legame Ag-Ab: assicura che la metodica non produca colorazioni aspecifiche. Si utilizzano sezioni di controllo negativo di cui si conosce con certezza l'assenza di un determinato antigene che vengono processate e colorate insieme ai campioni da esaminare. La specificità anticorpale può essere valutata anche sostituendo l'anticorpo primario con siero non immune prodotto dalla stessa specie animale o con diluente/tampone. L'eventuale colorazione osservata sarà da attribuire a legami aspecifici dei reagenti usati o all'attività della perossidasi endogena.

- Controllo di sensibilità del metodo: assicura che la metodica sia in grado di rilevare anche basse concentrazioni di antigene utilizzando tessuti a bassa espressione antigenica.
- Controllo di reazione: si utilizzano sezioni di controllo positivo di cui si conosce con certezza la presenza di un determinato antigene. Assicura che la reazione immunoistochimica sia avvenuta correttamente.

## **1.2 INQUADRAMENTO DEI LINFOMI E L'IMPORTANZA DIAGNOSTICA DELL'IMMUNOISTOCHEMICA**

I linfomi sono tumori maligni che prendono origine dalle cellule del sistema linfatico che hanno il compito di difendere l'organismo dagli agenti esterni. I linfomi si classificano in base alla cellula di origine, che può essere un linfocita di linea B, di linea di T o Natural killer. Un gruppo particolare di linfomi è rappresentato dal linfoma di Hodgkin che a lungo è stato considerato di derivazione da una cellula di origine diversa dai linfociti B o T. Oggi pur riconoscendone la derivazione dai linfociti B per convenzione il gruppo dei linfomi di Hodgkin viene considerato a parte nella classificazione corrente dell'organizzazione Mondiale della Sanità rivista nel 2008, mentre tutti gli altri sono convenzionalmente considerati linfomi non Hodgkin (Swerdlow et al. 2008).

I linfomi possono presentarsi come masse nodali quando si accrescono nei linfonodi di una o più stazioni, superficiali o profonde, come linfonodi del collo, ascellari, mediastinici, inguinali e addominali. I linfomi possono anche interessare il midollo osseo e diffondere attraverso il sangue come una leucemia, oppure possono coinvolgere come sedi extranodali tutti gli organi dei vari apparati, la cute e il sistema nervoso centrale.

Nel sospetto clinico di linfoma l'esame istologico del tessuto patologico è fondamentale per l'inquadramento diagnostico, attraverso l'integrazione dei parametri morfologici, fenotipici e molecolari. L'immunoistochimica è una tappa fondamentale sono numerosi gli antigeni ricercati nei tessuti, selezionati in base alle caratteristiche morfologiche della malattia (Wright DH et al 2006).

Alcuni antigeni sono considerati di linea e sono quelli che indicano l'appartenenza del linfoma al gruppo di Bo dei T. Sono antigeni di linea B il CD20, il CD79 e il PAX5. Sono antigeni di linea T il CD3 e il CD5. Sono antigeni di linea Naturalkiller il CD56 e il CD57. Altri antigeni individuano lo stadio di maturazione: il CD34 il tdt marcano lo stadio di linfoblasto o di precursore linfoide, mentre tutti gli stadi differenziativi post-linfoblastici sono tdt e CD34 negativi.

Alcuni antigeni sono tipici della differenziazione B pre-centro germinativo (CD5, CD23), altri indicano lo stadio di centro germinativo (CD10, BCL6) e altri lo stadio post-centro germinativo (MUM1, CD38). Nelle cellule T il CD4 indica la cellula a differenziazione Helper e il CD8 quella Suppressor. Nel linfoma di Hodgkin le cellule diagnostiche sono negative per marcatori di linea T e B e sono positive per CD30 e CD15. Alcuni marcatori possono indicare la presenza di traslocazioni cromosomiche specifiche per alcuni tipi di linfoma: la proteina BCL1 è espressa nel linfoma mantellare per la traslocazione t(11; 14), la proteina ALK nel linfoma anaplastico per la traslocazione t(2; 5) e la proteina BCL2 nel linfoma follicolare per la traslocazione t(14;18). Altri marcatori servono ad indicare il grado di proliferazione cellulare come il Ki 67/Mib-1 (Zhang et al., 2014).

### **1.3 I LINFOMI CUTANEI**

I linfomi cutanei primitivi formano un gruppo eterogeneo di linfomi a cellule B e T che mostrano notevoli differenze dal punto di vista clinico, istologico, immunofenotipico e prognostico. Sono definiti come linfomi non Hodgkin della cute con nessuna evidenza di malattia extra-cutanea al momento della diagnosi. Si distinguono classicamente nel linfoma cutaneo a cellule T (CTCL) e nel linfoma cutaneo a cellule B (CBCL) (Willemze R. et al. 2018; Goteri G. et al. 2007). Nel linfoma cutaneo a cellule T si distinguono le due forme più conosciute che sono:

- La Micosi Fungoide (MF)
- La sindrome di Sezary (SS)

La Micosi fungoide (MF) è il tipo più comune di CTCL e rappresenta quasi il 50% di tutti i linfomi che insorgono principalmente nella cute. (Willemze T et al. 2018). È caratterizzato da un'evoluzione lenta e prolungata e generalmente presentano un'ottima

prognosi. La Sindrome di Sézary (SS), è clinicamente descritta da un'eritrodermia pruriginosa, linfadenopatia generalizzata e linfociti T maligni (cellule di Sézary) espresse nella cute, nel sangue e nei linfonodi, ed è considerato un CTCL leucemicovariante con un comportamento clinico aggressivo e prognosi infausta.

### **1.3.1 MICOSI FUNGOIDE**

La micosi fungoide (MF) si mostra solitamente negli individui fra i 40 e i 60 anni ed è più comune nel sesso maschile. È comunque una patologia di carattere raro: la sua incidenza totale, comprese le sue varianti, è di 4 persone colpite ogni milione di persone. La MF ha un comportamento clinico di tipo indolente con una lenta progressione, nell'ordine degli anni o talora dei decenni. Essa mostra un processo linfoproliferativo suddiviso in più tappe. Esordisce con chiazze eritematose, rotondeggianti od ovalari, a bordi netti. Le lesioni iniziali spesso coinvolgono la regione glutea o altre zone non fotoesposte, come il tronco e la radice degli arti. Le chiazze possono presentare aspetto desquamativo, psoriasiforme, ittiosiforme, eczematoide o cheratosico, e sono poco pruriginose. Possono presentare inizialmente tendenza alla regressione spontanea, soprattutto dopo l'esposizione solare o all'utilizzo di farmaci corticosteroidi topici, per poi ripresentarsi nella stessa sede, con tendenza ad aumentare in numero e dimensioni. Vi è poi evoluzione allo stadio di placca, con infiltrazione delle chiazze, ed eventualmente di nodulo tumorale. Alcuni pazienti evolvono dalla fase in chiazza alla fase eritrodermica, caratterizzata da eritrodermia esfoliativa e intenso prurito; si osservano aree di risparmio delle pieghe e di ipercheratosi palmo-plantare. Negli stadi avanzati della malattia possono venire coinvolti i linfonodi e gli organi interni. I pazienti in stadio tumorale presentano caratteristicamente una combinazione di chiazze, placche e noduli tumorali, che possono mostrare ulcerazione. Se al momento della presentazione clinica sono presenti solo noduli tumorali la diagnosi di MF è improbabile e vanno considerati in diagnosi differenziale altri tipi di CTCL (Willemze R. 2018).

### 1.3.2 SINDROME DI SEZARY

La sindrome di Sézary (SS) è considerata una forma di linfoma/leucemia con interessamento della cute e del sangue periferico. Storicamente la SS viene definita come una malattia caratterizzata dalla triade: eritrodermia, linfadenopatia generalizzata e la presenza di un clone neoplastico T-cellulare con nucleo cerebriforme (cellule di Sézary) nella cute, nei linfonodi e nel sangue periferico. Anche questa come la Micosi Fungoide è una forma rara e l'età media dell'insorgenza della malattia è risultata pari a 65 anni ed è maggiormente colpito il sesso maschile. La SS è caratterizzata dalla comparsa de novo o da precedente MF di un'eritrodermia spesso intensamente pruriginosa, che può essere associata ad intensa esfoliazione, edema e lichenificazione. Sono altresì comuni: linfadenopatia, alopecia, onicodistrofia e ipercheratosi palmo-plantare. Negli stadi avanzati vi può essere interessamento oculare, che si manifesta con blefarocongiuntivite ed ectropion. Per quanto riguarda le eritrodermie la diagnosi differenziale comprende: reazioni cutanee da farmaci, reticulosi attinica, reazioni pseudolinfomatose indotte da farmaci, gravi reazioni di tipo eczematoso, psoriasi, dermatite seborroica, parapsoriasi, pitiriasis rubra pilaris e stati di fotosensibilità (es. lupus e dermatomiosite). Le cellule di Sézary sono linfociti atipici dotati di nucleo convoluto o cerebriforme, presenti sia nella cute che nel sangue. L'istologia nella SS può risultare simile a quella della MF; tuttavia, l'infiltrato cellulare tende ad essere spesso omogeneo e l'epidermotropismo può a volte essere assente. Da sottolineare è il fatto che in più di un terzo delle biopsie di pazienti con la SS il quadro istologico risulta non specifico, potendo riprodurre pattern presenti nelle patologie benigne di tipo infiammatorio (perivascolare superficiale, perivascolare superficiale e profondo, spongiotico, psoriasiforme, con infiltrato lichenoidale etc.). Questa situazione spesso rende difficoltosa una diagnosi e un trattamento precoci. I linfonodi coinvolti mostrano in modo caratteristico un infiltrato di cellule di Sezary denso con perdita della normale architettura linfonodale. Anche il midollo osseo può a volte essere coinvolto, ma l'infiltrato è spesso sparso e maggiormente interstiziale (Wieselthier, J.S et al. 1990).

## 1.4 PON2

PON2 (paraoxonasi / arilesterasi 2 sierica) è un enzima che nell'uomo è codificato dal gene PON2; è un enzima antiossidante e disintossicante che riduce lo stress ossidativo intracellulare. In particolare, si lega direttamente al coenzima Q10, un cofattore della catena di trasporto degli elettroni, e agisce come “spazzino” di specie reattive dell'ossigeno. È localizzato nella membrana mitocondriale interna e, in risposta allo stress ossidativo, può traslocare nella membrana plasmatica, in seguito al rilascio intracellulare di calcio indotto dal danno ossidativo. I dati sull'espressione di PON2 nella neoplasia ematologica sono scarsi e frammentati. Livelli elevati di espressione di PON2 predicono scarsi esiti clinici sia in età pediatrica che nell'adulto nella leucemia linfoblastica acuta a cellule B (Kang H et al. 2010; Pan L. et al. 2021). Al contrario, l'espressione di PON2 non era associata a risultati clinici per i linfomi a cellule B maturi e il mieloma multiplo. Inoltre, una marcata sovraespressione enzimatica è stata osservata nella leucemia mieloide cronica, nei linfociti infettati dal virus della leucemia a cellule T e nei linfomi non-Hodgkin (Frank O. et al. 2006; Witte I. et al. 2011). È interessante notare che Witte et al. Hanno riportato che la PON2 risulta sovraregolata nelle fasi iniziali di diversi sottotipi di cancro, mentre è sottoregolata nelle fasi avanzate, come nel nostro caso. Ciò potrebbe indicare che, soprattutto nelle prime fasi della formazione del cancro, la funzione antiossidante e antiapoptotica della PON2 contribuisce a generare la condizione per la trasformazione maligna. Nel nostro studio preliminare, abbiamo osservato un'elevata espressione della PON2 solo nella fase iniziale di MF mentre in SS è completamente soppressa, suggerendo che la sottoregolazione dell'enzima potrebbe contribuire alla leucemogenesi nella SS.

## **SCOPO DELLA TESI**

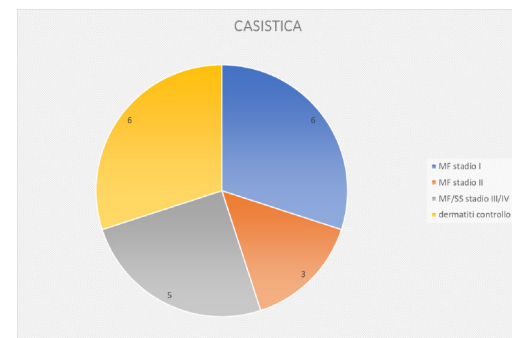
Lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare il ruolo diagnostico e prognostico dell'anticorpo PON2 in diversi stadi della micosi fungoide e della Sindrome di Sezary, conducendo un'analisi retrospettiva su un totale di 20 campioni di tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina, prelevati dall'archivio dell'Anatomia Patologica di Ancona.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 MATERIALI

Dall'archivio dell'Anatomia Patologica dell'Azienda Universitaria Ospedaliera di Ancona sono stati selezionati 20 casi di Micosi Fungoide e di Sindrome di Sezary diagnosticati nel periodo 2005-2021. Specificatamente sono stati selezionati:

|                               |                 |
|-------------------------------|-----------------|
| • n°6 MF                      | • STADIO I      |
| • n°3 MF                      | • STADIO II     |
| • n°5 MF/SS                   | • STADIO III/IV |
| • n°6 dermatite infiammatoria | • CONTROLLO     |



### 2.2 METODI

#### 2.2.1 TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

I preparati istologici relativi ad ogni paziente sono stati allestiti a partire da campione fissati in formalina, processati secondo le linee guida, inclusi in paraffina e sezionate al microtomo. Le fasi fondamentali dell'allestimento del preparato istologico sono le seguenti.

##### **Fissazione e campionamento**

Il campione arriva al reparto di anatomia patologica in un contenitore immerso in formalina neutra tamponata al 10% (formaldeide al 4%). La fissazione è una tappa fondamentale per mantenere inalterate le caratteristiche del tessuto da esaminare per conservarne la struttura presente allo stato vivente. In particolare, il fissativo impedisce i processi degenerativi autocritici, l'azione distruttiva di agenti esterni, protegge il tessuto da stress fisici e ne favorisce l'indurimento, preparando alle fasi successive di processazione taglio. Dopo l'accettazione il pezzo chirurgico viene campionato in modo tale da prelevare e processare le aree più significative per la diagnosi. Le parti rimanenti possono essere conservate in archivio in formalina anche per lungo tempo; infatti, tessuti fissati si mantengono inalterati per anni.



## **Processazione**

la fase di processazione allo scopo di ottenere l'infiltrazione di tutto il tessuto da parte del mezzo di inclusione. Quest'ultimo deve essere una sostanza che penetrando completamente i tessuti conferisca loro una consistenza uniforme e idonea ad ottenere sezioni sottili di pochi  $\mu\text{m}$ . I tessuti correttamente inclusi possono essere conservati in archivio per tempi molto lunghi.

Le tappe fondamentali della processazione dei campioni sono le seguenti:

### 1. Disidratazione

Questa fase ha lo scopo di allontanare l'acqua dai tessuti favorendo la successiva impregnazione nel mezzo di inclusione incompatibile con soluzioni acquose. La disidratazione avviene mediante passaggi dei tessuti in soluzioni a concentrazione scalare crescenti di alcol etilico iniziando dall'alcol al 50% e fino ad arrivare all'alcol etilico assoluto anidro.

### 2. Chiarificazione

Viene chiamata anche diafanizzazione poiché in questa fase i tessuti acquistano un aspetto brillante e traslucido. Per questo scopo viene utilizzata una sostanza organica, lo xilolo (o xilene), la cui funzione è quella di sostituire, nei tessuti, l'alcool etilico in cui la paraffina non è solubile e preparare il tessuto alla fase successiva.

### 3. Impregnazione

Questa fase avviene tramite immersione del campione nel mezzo di inclusione scelto, che nella routine istologica è rappresentato dalla paraffina. La paraffina è una cera composta da una miscela di idrocarburi a catena lunga. Viene usata allo stato liquido ad una temperatura di 56-58 °C, per permettere una completa e corretta infiltrazione del tessuto. Esistono vari tipi di paraffine che differiscono tra di loro per la miscelazione, per il punto di fusione e per la durezza del preparato, una volta solidificato.

La durata dell'intero processo varia a seconda della grandezza dei campioni va da 6-8 ore per i campioni più piccoli o piccole biopsie, a 12-13 ore per campioni più grandi.

## **Inclusione**

Completata la fase di impregnazione, viene posto in uno stampo metallico che viene riempito di paraffina liquida e appoggiato su di una superficie fredda alla temperatura di 5-10 °C per permettere la solidificazione. Questa fase è fondamentale per ottenere un blocchetto solido di paraffina contenente il nostro campione e permetterne il taglio al microtomo.

## **Sezionamento**

Il campione viene tagliato al microtomo in sezioni di circa 4-5 µm che vengono posizionate sui vetrini portaoggetto. Per il taglio del blocchetto viene raffreddato alla temperatura di circa 18-20 °C, poiché a questa temperatura la paraffina assume una maggiore consistenza rendendo il taglio più facile. La prima fase del taglio è la fase di sgrasso che serve ad eliminare la paraffina in eccesso; quindi, si procede al taglio vero e proprio delle sezioni. Le sezioni ottenute vengono adagiate su di una superficie di acqua a temperatura ambiente, per permettere la distensione delle pieghe più grandi; successivamente, con l'aiuto di un pennello di un vetrino portaoggetto le sezioni vengono trasferite in un bagno di acqua calda alla temperatura di circa 40 °C, in questo modo la paraffina si ammorbidisce permettendo la completa distensione anche delle pieghe più sottili. La fettina ottenuta viene prelevata dall'acqua calda con un vetrino portaoggetto, pulito e possibilmente trattato con adesivo o con cariche elettriche positive, in modo da favorire la massima adesione del tessuto al vetro e limitare il rischio del distacco. A questo punto la sezione di tessuto viene messa ad asciugare in una stufa a 37 °C per tutta la notte. L'uso di vetrini che presentano cariche elettriche è indispensabile per l'esecuzione delle metodiche immunoistochimiche per le quali sono previste tappe di smascheramento antigenico con trattamento dei tessuti ed elevate temperature, che possono facilmente condurre al distacco delle sezioni.

In particolare la metodica per la colorazione immunoistochimica dell'anticorpo PON2 è stata eseguita con l'immunocoloratore Autostainer Link-48-Dak utilizzando il seguente protocollo:

- 1- Sparaffinatura e smascheramento: per permettere la corretta colorazione immunoistochimica dei tessuti, si è proceduto a sparaffinare e smascherare i siti

antigenici con lo strumento DAKO PT LINK che utilizza il tampone ENVISION FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH, Contenente tampone TRIS EDTA a pH 9.

- 2- Lavaggi in tampone: dopo aver ripristinato la reattività antigenica del recettore, le sezioni sono state trasferite dal DAKO PT Link alla stazione di lavaggio e trattate con soluzione salina tamponata-Tris contenente Tween 20, a pH 7.6 ENVISION FLEX WASH BUFFER, 20X per circa 5 minuti.
- 3- Blocco delle perossidasi endogene: Il blocco dell'attività endogena della perossidasi è stato eseguito dall'immunocoloratore DAKO Autostainer Link 48 mediante dispensazione sopra ogni vetrino del reagente ENVISION PEROXIDASE-BLOCKING REAGENT, contenente tampone fosfato e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, per 7 minuti a temperatura ambiente. Questo passaggio è fondamentale per evitare colorazioni aspecifiche dovuto alla presenza di perossidasi endogene nei tessuti; l'acqua ossigenata come substrato della perossidasi, determina il decadimento dell'attività enzimatica.
- 4- Lavaggi in tampone: con tampone ENVISION FLEX WASH BUFFER, 20X (1:20).
- 5- Incubazione delle sezioni con siero di capra: al 5% per 10 minuti a temperatura ambiente.
- 6- Incubazione delle sezioni con anticorpo primario: l'anticorpo primario utilizzato è un anticorpo policlonale di coniglio contro PON2 umano (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA. *L'anticorpo è stato messo gentilmente a disposizione dalla Prof.ssa Emanuelli del Dipartimento di Biochimica dell'Università Politecnica delle Marche*), diluito 1:1000 con ENVISION FLEX ANTIBODY DILUENT, contenente tampone Tris a pH 7.2, della ditta Dako. Le sezioni vengono coperte con 200 µl di anticorpo alla diluizione di lavoro e vengono lasciate incubare per 60 minuti a temperatura ambiente.
- 7- Lavaggi in tampone: ENVISION FLEX WASH BUFFER, 20X (1:20).

- 8- Incubazione delle sezioni con sistema di rivelazione polimerico: le sezioni vengono fatte incubare per 20 minuti a temperatura ambiente con il sistema di rivelazione polimerico ENVISION FLEX/HRP.
- 9- Lavaggi in tampone ENVISION FLEX WASH BUFFER, 20X (1:20).
- 10- Incubazione con substrato cromogeno: la colorazione enzimatica è stata sviluppata in presenza di substrato cromogeno DAB (3,3'-diamminobenzidina tetracloridrato) presente nel reagente ENVISION FLEX DAB + CHROMOGEN, il quale è stato diluito in ENVISION FLEX SUBSTRATE BUFFER, soluzione tamponata contenente perossido di idrogeno; la soluzione di lavoro preparata a fresco, è stata ottenuta aggiungendo una goccia di cromogeno concentrato ad 1 ml di tampone e le sezioni sono state incubate per 10 minuti a temperatura ambiente. La perossidasi riduce l'acqua ossigenata ad H<sub>2</sub>O e in particolare promuove il trasferimento di un elettrone dal cromogeno all'acqua ossigenata. Il prodotto dell'ossidazione è insolubile e tende quindi a precipitare nel sito di reazione, dove avremo un precipitato di colore marrone.

Le sezioni vengono incubate per 10 minuti con la soluzione de lavoro de DAB a temperatura ambiente, vengono utilizzati 200 µl di DAB per ogni vetrino.

- 11- Lavaggi in H<sub>2</sub>O distillata: per bloccare la reazione di ossidoriduzione.
- 12- Lavaggio in H<sub>2</sub>O corrente: che permette l'eliminazione della DAB in eccesso.
- 13- Controcolorazione nucleare: i vetrini vengono immersi in Ematossilina di Mayer per circa 1 minuto. La colorazione mette in evidenza il nucleo e dà maggiori informazioni sul tessuto, in modo da poter localizzare la positività anche all'interno della singola cellula.
- 14- Passaggio rapido in acqua acidulata: per eliminare gli eccessi di ematossilina.
- 15- Lavaggio in acqua corrente: fondamentale perché permette la fissazione del colorante alle strutture tissutali e favorisce l'eliminazione degli eccessi.
- 16- Disidratazione: attraverso passaggi dei vetrini di almeno 2-3 minuti in una serie scalari di alcoli crescenti fino all'alcol assoluto.

17- Chiarificazione: le sezioni vengono chiarificati in passaggi successivi in xilolo per favorire il montaggio. Lo xilolo infatti è un solvente del balsamo utilizzato.

18- Montaggio del vetrino coprioggetti con balsamo.

### **2.3 ANALISI STATISTICA**

I dati ottenuti dallo studio sono stati analizzati statisticamente per evidenziare la presenza di una differente espressione dell'anticorpo tra i casi presi in esame. Il test statistico utilizzato è stato il test di Mann-Whitney. La correlazione è stata considerata significativa con valori di  $p < 0,05$ .

### 3. RISULTATI

La valutazione dell'espressione di PON-2 è stata effettuata attraverso l'utilizzo di un microscopio Nikon Eclipse E600 dotato di una fotocamera digitale Nikon DS-Vi1 applicando i seguenti criteri:

- Percentuale di cellule positive
- Intensità di colorazione: range da negativo a forte (-/+//+/++//+++)

Tali dati sono stati valutati in modo indipendente da 2 patologi (accordo >95%).

| CASO                                  | PON-2                 |           |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------|
|                                       | % di cellule positive | intensità |
| <b>MF CLASSICA (chiazza/iniziale)</b> |                       |           |
| CASO 1                                | 30                    | ++        |
| CASO 2                                | 30                    | ++        |
| CASO 3                                | 30                    | ++        |
| <b>MF CLASSICA (placca)</b>           |                       |           |
| CASO 4                                | 10                    | +         |
| CASO 5                                | 80                    | +++       |
| CASO 6                                | 95                    | +++       |
| CASO 7                                | 90                    | +++       |
| CASO 8                                | 5                     | ++        |
| CASO 9                                | -                     | NEG       |
| <b>MF CON ERITRODERMIA (SS)</b>       |                       |           |
| CASO 10                               | -                     | NEG       |
| CASO 11                               | -                     | NEG       |
| CASO 12                               | -                     | NEG       |
| CASO 13                               | -                     | NEG       |
| CASO 14                               | -                     | NEG       |
| <b>DERMATITE CRONICA</b>              |                       |           |
| CASO 15                               | 40-50                 | ++        |
| CASO 16                               | 40                    | ++        |
| CASO 17                               | 10                    | +         |
| CASO 18                               | 30                    | ++        |
| CASO 19                               | 10                    | ++        |
| CASO 20                               | 30                    | ++        |

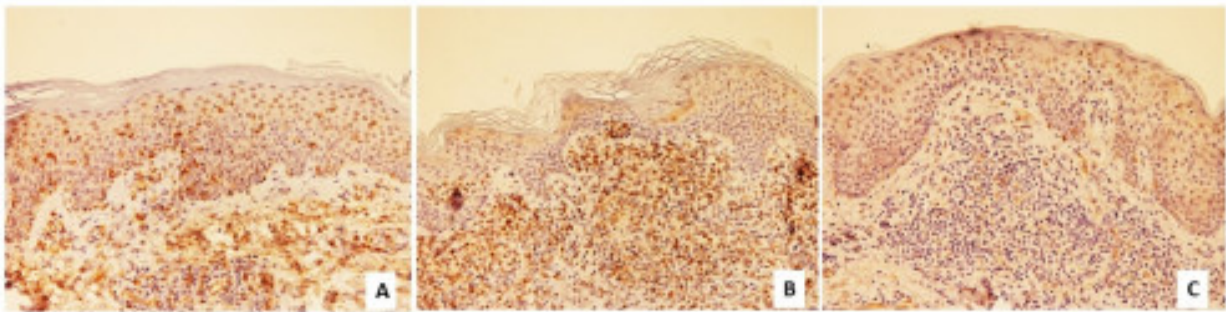
Dai risultati ottenuti in tabella si è osservata una differenza statisticamente significativa:

- nelle biopsie cutanee MF/SS stadio III/IV rispetto ai controlli (p=0.032);

- nelle biopsie cutanee MF rispetto alle MF/SS di stadio III/IV ( $p=0.03$ )

Mentre non si è osservata una differenza statisticamente significativa:

- nelle biopsie cutanee MF rispetto ai controlli ( $p=0.415$ )



*Fig6: Espressione di PON2 in diverse lesioni istologiche composte da infiltrato superficiale con esocitosi epidermica: a) dermatite superficiale cronica che mostra numerose cellule linfoidi colorazione per PON2, nell'epidermide e nel derma (100X); b) Micosi fungoide che mostra una forte colorazione nelle cellule linfoidi compreso l'ascesso di Pautrier (100X); c) Sindrome di Sezary nelle quali cellule le linfoidi risultano negative (100X).*

## DISCUSSIONE

I linfomi cutanei primitivi sono definiti come linfomi cutanei non-Hodgkin senza evidenza di malattia extracutanea al momento della diagnosi. Si distinguono classicamente nel linfoma cutaneo a cellule T (CTCL) e nel linfoma cutaneo a cellule B (CBCL)(Willemze R. et al. 2018; Goteri G. et al. 2007). La micosi fungoide (MF) è il tipo più comune di CTCL e rappresenta quasi il 50% di tutti i linfomi che insorgono principalmente nella cute (Willemze R. et al. 2018). E' caratterizzato da una lenta evoluzione e decorso prolungato, con una ottima prognosi. La sindrome di Sézary (SS), che è clinicamente descritta da una triade di eritroderma pruriginoso, linfadenopatia generalizzata e linfociti T maligni (cellule di Sézary) espressi nella cute, nel sangue e nei linfonodi, è considerata una variante leucemica del CTCL con un comportamento clinico aggressivo e prognosi infausta.

La paraonasi-2 (PON2), appartenente alla famiglia multigenica delle paraonasi (PONs), è un enzima intracellulare situato nel reticolo endoplasmatico, nei mitocondri e nella membrana plasmatica, ed è espresso ubiquitariamente nei tessuti umani. La PON2, che esercita un'azione antiossidante e un'attività anti-apoptotica, sembra avere un ruolo cruciale nella sopravvivenza e nell'invasione delle cellule tumorali (Sartini et al. 2021). In particolare, diversi studi hanno dimostrato che la PON2 è sovraregolata in varie neoplasie maligne solide, tra cui il melanoma cutaneo e i tumori cutanei non melanoma (NMSC), suggerendo un ruolo nei meccanismi di proliferazione, migrazione, metastasi e chemioresistenza delle cellule tumorali (Sartini D. et al. 2021; Bacchetti I et al 2021). I dati relativi al ruolo esercitato dalla PON2 nelle neoplasie ematologiche sono limitati e nessuno studio è stato ancora condotto per esplorare l'espressione della PON2 in CTCL. Pertanto lo scopo del presente studio è stato quello di indagare il ruolo diagnostico e prognostico della PON2 in diversi stadi di micosi fungoide e della sindrome di Sezary (secondo WHO-EORTC 2018). Ciò che abbiamo osservato è che vi è un'elevata espressione della PON2 solo nella fase iniziale della Micosi Fungoide (MF), mentre nella Sindrome di Sezary(SS) è completamente soppressa, suggerendo che la sottoregolazione dell'enzima potrebbe contribuire alla leucemogenesi nella SS. Questo studio preliminare mostra una ridotta espressione intratumorale di PON2 in MF/SS rispetto ai pazienti con MF, indicando un'espressione stadio-specifica dell'enzima. Questi risultati sembrano suggerire che la PON2 potrebbe essere coinvolta



nella fase leucemica del CTCL e l'utilizzo di tale marcatore potrebbe essere da supporto come strumento diagnostico e prognostico nei pazienti con MF/SS. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo esatto della PON2 in CTCL.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bacchetti T, Salvolini E, Pompei V, et al. Paraonase-2: A potential biomarker for skin cancer aggressiveness. *Eur J Clin Invest.* 2021;51:e13452.
2. Frank O, Brors B, Fabarius A, et al. Gene expression signature of primary imatinib resistant chronic myeloid leukemia patients. *Leukemia*2006;20:1400-7.
3. Goteri G, Ranaldi R, Simonetti O, et al. Clinicopathological features of primary cutaneous B-cell lymphomas from an academic regional hospital in central Italy: no evidence of *Borrelia burgdorferi* association. *LeukLymphoma*2007;48:2184-8.
4. Kang H, Chen IM, Wilson CS, et al. Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;115:1394-405.
5. Leonardo E. *Morfologia Molecolare*, 1° ed, Padova, libreriauniversitaria.it, 2011
6. Pan L, Hong C, Chan LN, et al. PON2 subverts metabolic gatekeeper functions in B cells to promote leukemogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021;118:e2016553118.
7. Sartini D, Campagna R, Lucarini G, et al. Differential immunohistochemical expression of paraonase-2 in actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Hum Cell.* 2021;34:1929-1931.
8. Swerdlow S., Campo E., Harris NL, et al. *Classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues.* International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008.
9. Wright DH, Leong ASY, Addis BJ,. *Diagnostic Lymph node pathology.* Eds Hodder Arnold, London, 2006.
10. Wieselthier, J.S. and H.K. Koh, Sezary syndrome: diagnosis, prognosis, and critical review of treatment options. *J Am Acad Dermatol*, 1990. 22(3): p. 381-401.
11. Willemze R, Cerroni L, Kempf W, et al. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood* 2019;133:1703.
12. Willemze R. Mycosis fungoides variants-clinicopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg.* 2018 Mar;37(1):11-17.

13. Witte I, Altenhöfer S, Wilgenbus P, Amort J, Clement AM, Pautz A, Li H, Förstermann U, Horke S. Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death Dis* 2011; 2:e112. Page 5 of 6 *British Journal of Dermatology* 123456789.
14. Zhang XM, Aguilera N. Newimmunohistochemistry for B-cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138: 1666-1672.