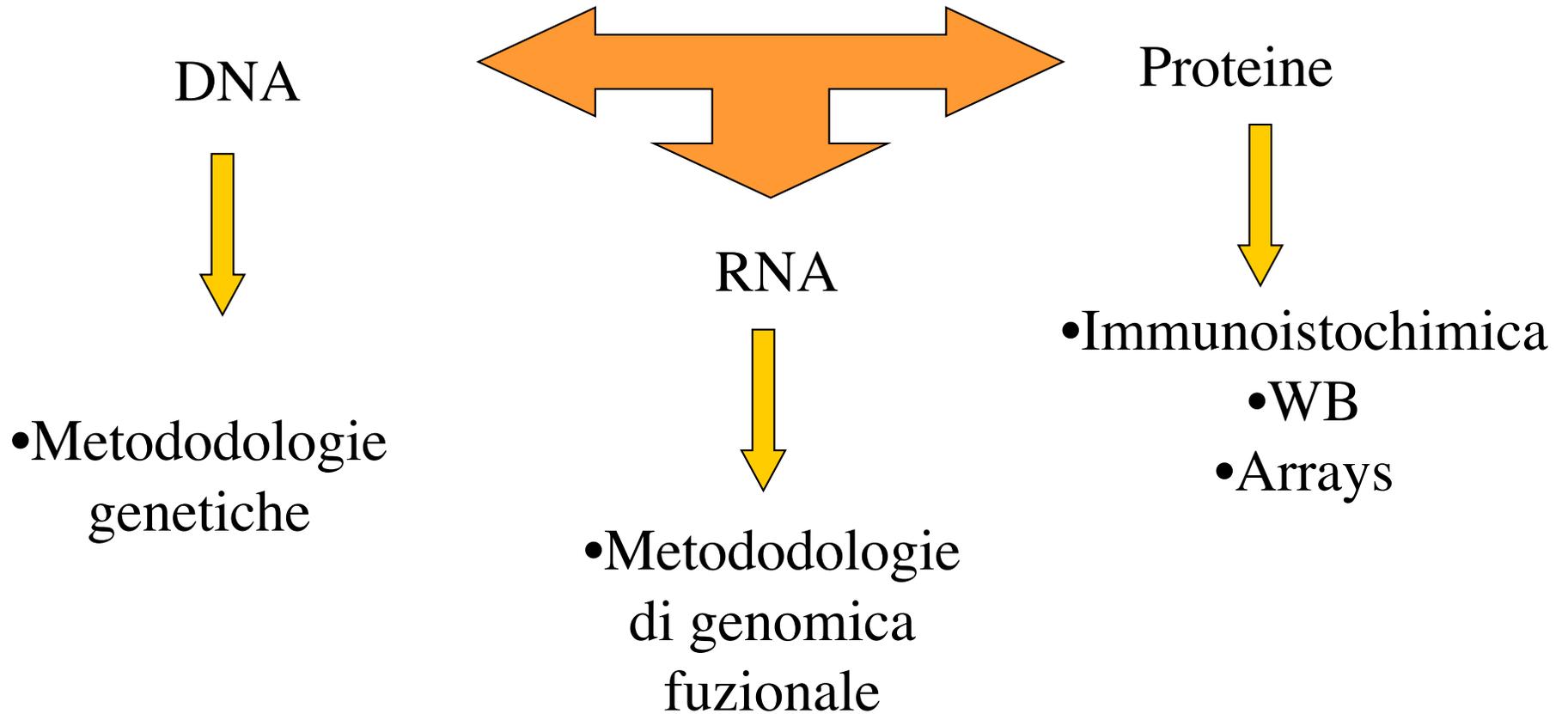


# TESSUTO FISSATO ED INCLUSO



# ***Nucleic acids isolation from FFPE, why?***

- *The only tissues available for any patient are formalin fixed paraffin embedded*
- *These tissues are available at the clinical level for any molecular analysis*
- *Today prognostic and predictive biomarkers are assessed in these tissues and tomorrow heterogeneity will*
- *The FFPE tissues stored in hospitals are the widest collections of human tissues with any type of even rare lesions available for clinical research*

Diagnostica Molecolare in  
tessuti fissati in formalina ed inclusi  
in paraffina

Analisi morfologica  
IHC  
IC  
ISH

Tecniche PCR  
Ricerca di mutazioni  
RT-PCR  
Ricerca di agenti infettivi

Tecniche estrattive

# Analisi Estrattive

- Determinazione di agenti infettivi  
CMV, EBV, HPV, MT, Leishmania,  
Borrelia, HCV.....
- Ricerca di mutazioni  
K-Ras, EGFr, B-Raf
- Determinazione dell'instabilità microsatellitare  
MSI
- Determinazione del profilo molecolare nei Ca. mammari  
OncoType DX

## VANTAGGI DEI TESSUTI D'ARCHIVIO

- ✓ **Analisi molecolari in tessuti ben definiti morfologicamente**
- ✓ **Studio di malattie rare**
- ✓ **Studi clinico-retrospettivi**
- ✓ **Studi di epidemiologia molecolare**
- ✓ **Rnasi endogene disattivate**
- ✓ **temperatura di inclusione in paraffina**

### *Limiti*

- **Acidi nucleici degradati**
- **Analisi proteiche limitate**
- **Analisi PCR di sequenze corte**

La classificazione morfologica rappresenta la **base diagnostica** per le malattie tumorali, **tuttavia**

Tumori dello stesso gruppo isto-morfologico hanno un **comportamento clinico** diverso perché le diverse lesioni hanno **caratteristiche biologiche diverse**.

C'è la possibilità di valutare nei **tessuti d'archivio** anche le **proprietà biochimiche** con diverse tecniche per poter rispondere alle maggiori richieste cliniche:

*? Quale è la prognosi dell'individuo, non gruppo patologico*

*? Quale è la probabilità di recidiva e metastasi al momento della resezione e diagnosi*

*? Quale è la risposta di ciascun individuo a trattamenti antitumorali siano essi tradizionali o indirizzati a particolari bersagli biologici*

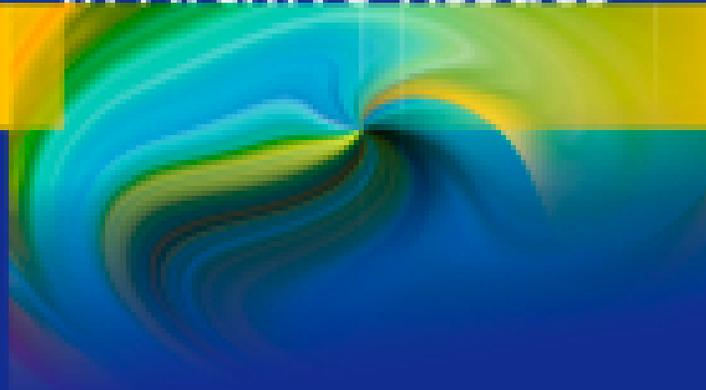
*Necessitano metodi analitici standardizzati caratterizzati da valori noti di specificità, sensibilità e predittività*

		MALATTIA		
TEST	PRESENTE	ASSENTE		
positivo	a	b	a+b	soggetti con test positivo
negativo	c	d	c+d	soggetti con test negativo
		a+c ammalati; b+d normali		

- ✓ **Sensibilità**: proporzione di soggetti malati con test positivo:  
 $a/a+c$
- ✓ **Specificità**: proporzione di soggetti normali con test negativo:  
 $d/b+d$
- ✓ **Valore predittivo di un test positivo**: proporzione di soggetti ammalati tra quelli che hanno un test positivo:  $a/a+b$
- ✓ **Valore predittivo di un test negativo**: proporzione di soggetti normali tra quelli che hanno un test negativo:  $d/c+d$

*Giorgio Stanta Editor*

# Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues



 Springer

# Microdissezione

E' un metodo per ottenere cellule pure da una specifica regione microscopica di sezione tissutale. Al microscopio i tessuti appaiono come complicate strutture eterogenee con centinaia di tipi di cellule bloccate in unità morfologiche. Le cellule di interesse analitico (es precancerose, neoplastiche, metastatiche..) sono affiancate da elementi tissutali eterogenei quali stroma, vasi sanguigni, componenti ghiandolari e muscolari, cellule adipose o cellule infiammatorie.

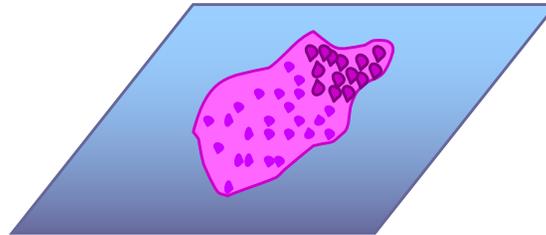
La microdissezione può essere indispensabile quando tecniche di biologia molecolare vengono applicate ai tessuti.

# Microdissezione in tessuti d'archivio

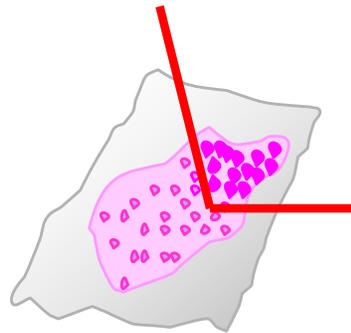
## *MECCANICA*

Sezione istologica pronta per l'esame

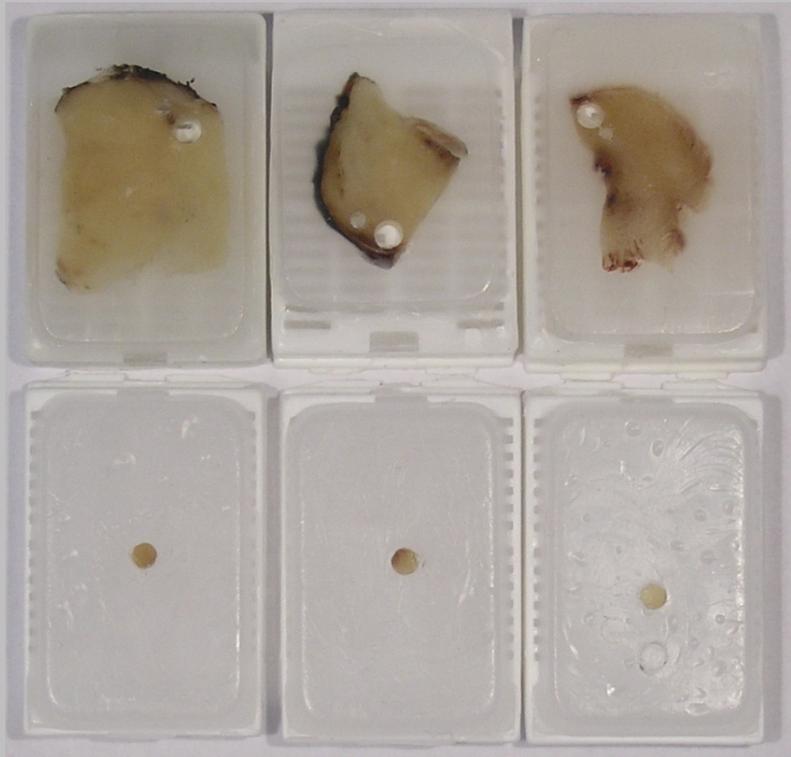
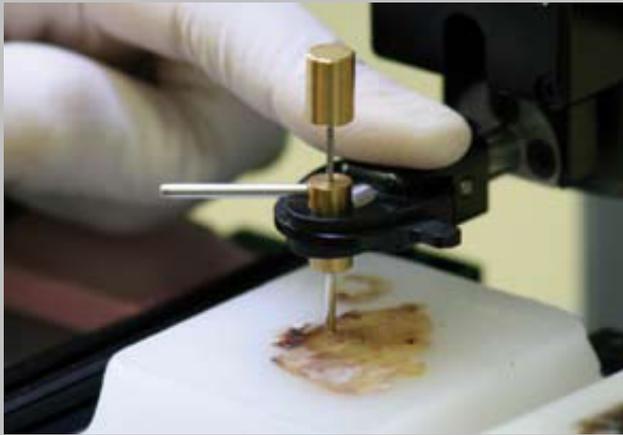
*H&E*



*Sezione successiva in  
bianco o blocchetto*



Area selezionata per la  
microdissezione

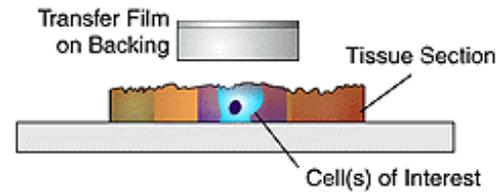


# Laser Capture Microdissection

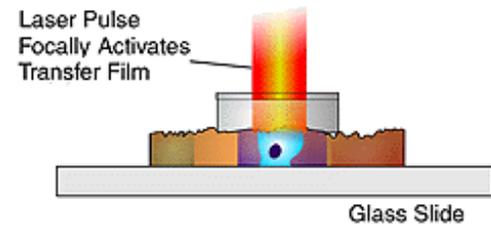
Attraverso il microscopio si individua il tessuto coperto dalla pellicola trasparente e si seleziona il cluster di cellule da isolare

E' tecnica automatizzata utile per standardizzare la microdissezione.

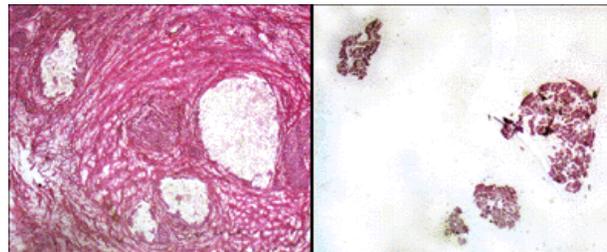
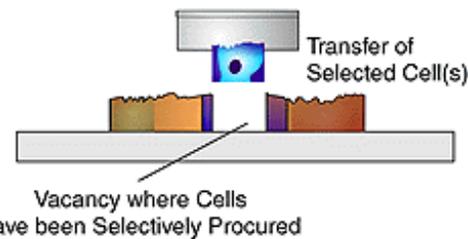
Vengono utilizzati un raggio laser, una pellicola particolare per trasferire le cellule interessate. Il film di trasferimento viene applicato alla superficie della sezione tissutale.



→ Cellule di interesse al centro del campo visivo



→ Si aziona il laser con un pulsante. In quel punto (raggio laser) la pellicola fonde con le cellule sottostanti prescelte. Quando si rimuove la pellicola le cellule scelte rimangono adese alla sua superficie, mentre il resto del tessuto viene lasciato sul vetrino.



# Laser Capture Microdissection

Impiego: per processare DNA, RNA o proteine dall'area selezionata. La tecnica non danneggia queste macromolecole perchè l'energia del laser viene assorbita dalla pellicola. Il materiale di partenza può essere fissato (in formalina o etanolo), incluso in paraffina o congelato. Le sezioni possono esser colorate con metodi standard per esaltare la popolazione cellulare di interesse.

# SI POSSONO ESTRARRE ACIDI NUCLEICI DA TESSUTI D'ARCHIVIO, MA

*Ciascun campione presenta diversi livelli di degradazione  
degli acidi nucleici anche se processati nello stesso  
laboratorio*

- ✓ **procedure non standardizzate**
- ✓ **tempo di prefissazione variabile**
- ✓ **fissativi diversi:**
  - formalina non tamponata (ac. formico )**
  - soluzione di Bouin (15 parti di acido picrico in  
soluzione satura acquosa, 5 parti di formaldeide 40% ed 1  
parte di acido acetico glaciale)**
- ✓ **temperatura di inclusione in paraffina**