

# **IMMUNOISTOCHEMICA IN DIAGNOSTICA ISTOPATOLOGICA**

**LA SELEZIONE DI QUALI ANTICORPI USARE IN ISTOPATOLOGIA DIAGNOSTICA DIPENDE DA VARI FATTORI:**

**1) DISPONIBILITA' DI ANTICORPI PER ANTIGENI SPECIFICI:**

- SPECIFICI DI UN UNICO TESSUTO/ORGANO E DELLE LESIONI CHE NE DERIVANO - LINEAGE-SPECIFIC (es. tireoglobulina per la tiroide)**
- SPECIFICI DI UNA FAMIGLIA DI TESSUTI - LINEAGE-RESTRICTED (es. citocheratine in tessuti epiteliali)**

**2) POSSIBILITA' DEGLI ANTICORPI DI REAGIRE CON L' ANTIGENE SPECIFICO IN TESSUTI FISSATI ED INCLUSI IN PARAFFINA**

**3) POSSIBILITA' DI RICERCARE IN POSITIVO O IN NEGATIVO DIFFERENTI ANTIGENI PER CONFERMARE LA DIAGNOSI - PANEL DI ANTICORPI**

**4) RICONOSCIMENTO ISTOLOGICO DI UNA LESIONE SOSPETTA PER CONFERMA O DIAGNOSI DIFFERENZIALE FRA UN LIMITATO NUMERO DI LESIONI (es. diagnosi differenziale fra diversi tipi di sarcoma cellule fusate)**

# ***IMMUNOISTOCHIMICA IN DIAGNOSTICA ISTOPATOLOGICA***

1. Richiede tempo, risorse umane e finanziarie
2. Numerosi anticorpi con sensibilità e specificità differente
3. Risultato dipende da fattori preanalitici
4. Interpretazione soggettiva semi-quantitativa. Si valuta l'intensità dello staining e la percentuale di cellule che lo portano.

$$\text{H score (histo)} = [1 \times (\% \text{ cells } 1+) + 2 \times (\% \text{ cells } 2+) + 3 \times (\% \text{ cells } 3+)]$$

**Lo score varia da 0 a 300. I preparati possono poi esser classificati come positivi o negativi a seconda di specifici cut-off**

# ***IMMUNOISTOCHIMICA IN DIAGNOSTICA ISTOPATOLOGICA***

- 1. Ab EPITELIALI***
- 2. Ab MESENCHIMALI***
- 3. EMOLINFOPOIETICI***
- 4. ORMONI, RECETTORI ORMONALI E PROTEINE CORRELATE***
- 5. ONCOPROTEINE, FATTORI DI CRESCITA E LORO RECETTORI***
- 6. MARKERS ASSOCIATI AL CICLO CELLULARE***
- 7. MARCATORI DELLA MATRICE EXTRACELLULARE (es Laminina)***

## ***MARKERS PER TESSUTI EPITELIALI: CITOCHERATINE***

↳ **LE CHERATINE:** Esistono cheratine basiche (1-8) e acide (9-20). I geni che le codificano appartengono a 2 famiglie di geni: il tipo I per le acide e il tipo II per le neutre o basiche. La distribuzione tissutale delle cheratine evidenzia una coespressione di particolari coppie ac/basiche in modo specifico per cellule e tessuti.

↳ **Catalogo di Moll-** raggruppa le citocheratine in base al loro PM e al loro punto isoelettrico. Si possono così suddividere in 3 gruppi: alto PM, medio PM e basso PM.

↳ **Epitelio semplice: 7-18, 8-18**

## MARKERS PER TESSUTI EPITELIALI: CITOCHERATINE

	BASICHE		ACIDE	
	Numero	kDa	Numero	kDa
CK-HMW	1-2	65-67	9	64
	3	64	10-11	56
			12	55
CK-MMW	4	59	13	51
	5	58	14-15	50
	6	56	16	48
			17	46
CK-LMW	7	54	18	45
	8	52	19	40
			20	46

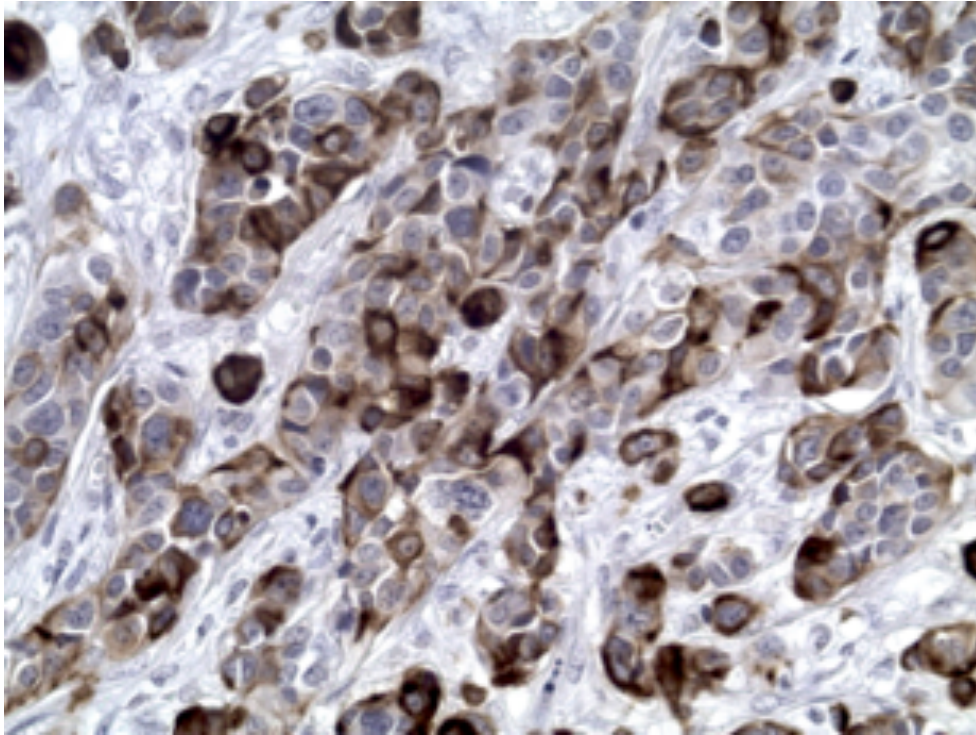
- Epitelio semplice e strutture ghiandolari

Caratteristica delle citocheratine è la loro conservazione anche negli elementi epiteliali che subiscono una trasformazione neoplastica.

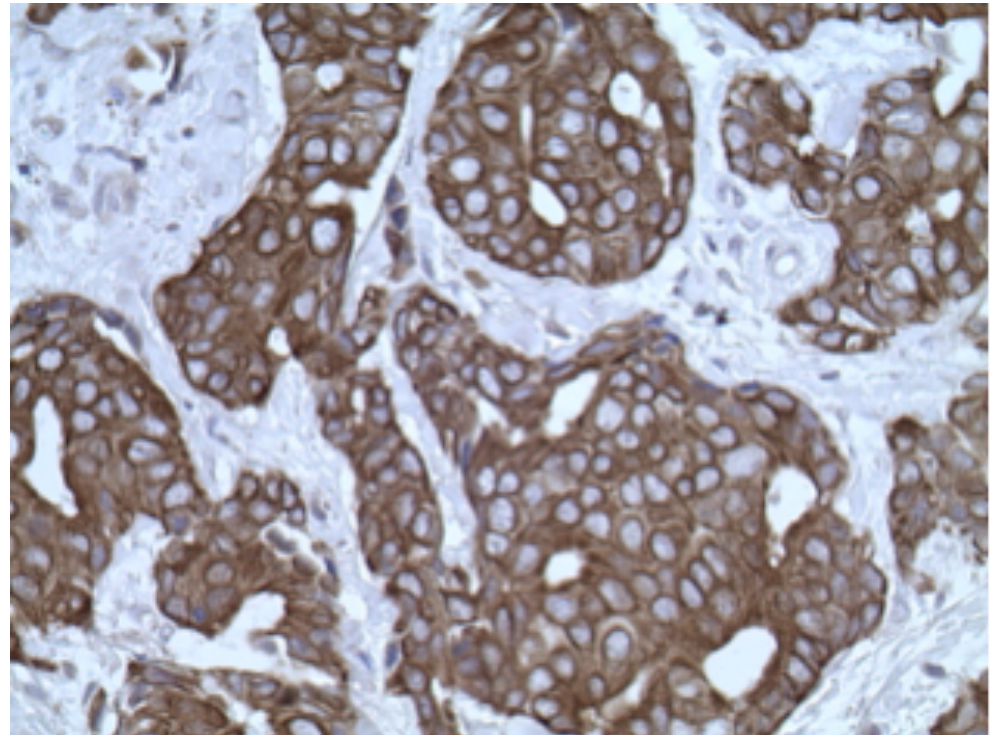
# MARKERS PER TESSUTI EPITELIALI: CITOCHERATINE

- LE **CITOCHERATINE** SONO UNA FAMIGLIA DI FILAMENTI INTERMEDI INTRACITOPLASMATICI CON VARIO PESO MOLECOLARE E pH (20 polipeptidi con diversi pattern di espressione in epiteli normali o neoplastici).
- SI USANO PER DEFINIRE L' ORIGINE EPITELIALE DI UNA NEOPIASIA O PIU' RARAMENTE PER CLASSIFICARE UN TUMORE EPITELIALE IN UN TIPO DI TUMORE SPECIFICO.
- ANTICORPI USATI (nome dell' anticorpo o dell' antigene):
  - -Citocheratine ad ampio spettro (AE1/AE3 e CAM5.2): cocktail di anticorpi che riconosce gran parte delle neoplasie epiteliali.
  - -**Citocheratine ad alto peso molecolare** (34 $\beta$ E12 o 309): reagiscono con le citocheratine 1,5,10 e 14 del catalogo di Moll. Sono espresse da **epiteli complessi** come quelli ghiandolari, transizionali, squamosi, dai mioepiteli e dalle cellule basali delle ghiandole prostatiche.
  - -**Citocheratine a basso peso molecolare** (35 $\beta$ H11): reagisce con citoch. 8 che presente negli **epiteli semplici** (es. fegato, ghiandola mammaria...), si usa in panel.
  - -**Citocheratina 20**: citocheratina espressa nella **mucosa colica** e negli epiteli transizionali (utile nel distinguerli da adenocarcinomi del polmone e della mammella)
- EPITHELIAL MEMBRANE ANTIGEN** (EMA)- POSITIVO NELLA MAGGIOR PARTE DEI TUMORI EPITELIALI (ma negativo nei carcinomi epatocellulari e prostatici e positivo in plasmocitomi, linfomi a grandi cellule, meningiomi, ecc.)
- ALTRI MARKERS EPITELIALI** - CA-125, CEA





***CK5,6, carcinoma mammario***



***CK8, carcinoma mammario***

# **MARKERS PER CELLULE EMOLINFOPOIETICHE 1**

## **MARKERS PER LINFOCITI**

- **ANTIGENE COMUNE PER I LEUCOCITI (CD45 - LCA)**: riconosce tutte le cellule emolinfopoietiche meno le plasmacellule, i linfomi a grandi cellule (entrambi positivi per EMA) ed i precursori degli eritrociti.
- **ANTIGENE PER LE CELLULE B (L26 , CD20)**: reagisce con la maggioranza dei linfomi a cellule B.
- **ANTIGENI PER CELLULE T (CD3 e CD45RO-UCHL1)**: CD3 reagisce con una proteina associata al recettore delle cellule T e riconosce il 75% dei linfomi T; UCHL1 riconosce anche i 3/4 dei linfomi T ma cross-reagisce anche con il 5% dei linfomi B e leucemie mieloidi.
- **ANTIGENE ASSOCIATO A LINFOMI ANAPLASTICI A GRANDI CELLULE (CD30 – Ki1)**: riconosce i linfomi anaplastici a grandi cellule , ma anche le cellule di Reed-Sternberg dei linfomi di Hodgkin ed i carcinomi embrionali.



# MARKERS PER CELLULE EMOLINFOPOIETICHE 2

## MARKERS PER LE CELLULE DI REED-STERMBERG

- CD15 (LeuM1): oltre alle cellule di R-S sono positivi anche granulociti e monociti ed occasionalmente in linfomi B e T, in adenocarcinomi (a. del polmone, ma non nei mesoteliomi).
- CD30 (Ki-1):

## MARKERS PER LE PLASMACELLULE

- ANTICORPI CONTRO LE CATENE LEGGERE  $\lambda$  E  $\kappa$  (monoclonalità).

## MARKERS PER ISTIOCITI E MACROFAGI

- CD68 (KP1): anticorpi contro una proteina associata ai lisosomi. Reagisce con monociti e macrofagi, ma è negativo nelle cellule di Langerhans e nella istiocitosi X.
- MURAMIDASI: enzima lisosomiale presente nelle cellule mielomonocitiche, anche nelle leucemie mielomonocitiche e nei macrofagi.

## MARKERS PER GRANULOCITI E MONOCITI

- MIELOPEROSSIDASI: riconosce i mielomonociti e le relative neoplasie. Importante nella D.D. tra cloroma e linfomi maligni.
- MURAMIDASI E CD15.

## MARKERS PER LE MASTCELLULE

- MAST-CELL-TRYPTASE

## MARKERS PER LE CELLULE DI LANGERHANS E DENDRITICHE

- S 100 PROTEIN: si usa nella diagnosi di istiocitosi a cellule di Langerhans, linfomi istiocitici, malattia di Rosai-Dorfman.

## MARKERS MISCELLANEI

- Bcl-2: oncogene la cui espressione previene l'apoptosi, l'iperplasia reattiva dei follicoli è negativa, mentre sono positivi i linfomi follicolari.

## **MARKERS PER I MELANOCITI**

*Sono markers utilizzati per distinguere i melanomi da altri tumori e per evidenziare il livello di infiltrazione, ma non li distinguono dai nevi.*

**-PROTEINA S100:** *reazione positiva sia nucleare che citoplasmatica (diffusa nei melanomi e localizzata ad alcune cellule in altre neoplasie, cellule dendritiche, condrociti).*

**-HMB45:** *è espresso da melanociti benigni e maligni e raramente da angiomiolipomi e linfangiomi. Ma reagisce solo con il 50% dei melanomi.*

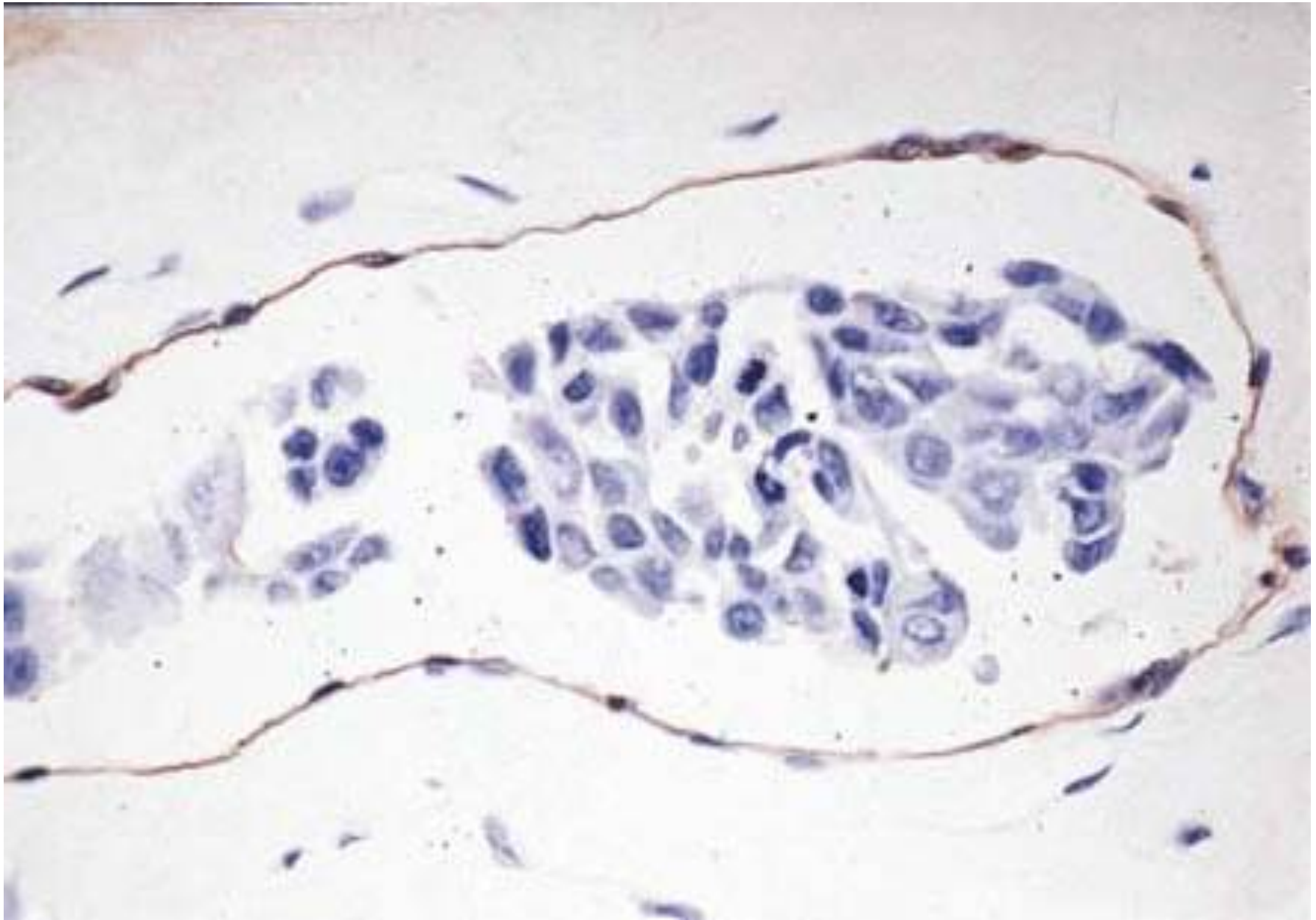
# MARKERS PER CELLULE ENDOTELIALI

**-FATTORE DI VON WILLEBRAND** (FACTOR VIII-RELATED ANTIGEN): reagisce con le cellule endoteliali sia dei vasi sanguigni che dei linfatici e con megacariociti e piastrine. Positivi risultano emangiomi, emangioendoteliomi, angiosarcomi e i sarcomi di Kaposi.

**-CD31:** (PECAM-1) anticorpo che reagisce con una molecola di adesione delle piastrine. Reagisce con cellule endoteliali normali e neoplastiche, prevalentemente a livello di membrana citoplasmatica.

**-AGGLIUTININA ULEX EUROPEA 1** (UEA1): lectina di origine vegetale che si lega ai carboidrati di superficie delle cellule endoteliali. Un anticorpo antilectina individua la lectina. Non specifico per neoplasie.

**-CD34:** reagisce con gli endoteli, ma non è specifico per i tumori. Reagisce anche con il tumore fibroso solitario, con le neoplasie stromali del GI, con il dermatofibrosarcoma protuberans, con l'emangiopericitoma, con il sex-cord stromal tumor dell'ovaio.



*Vascular invasion by breast carcinoma demonstrated by positivity of endothelial cells for Ulex europaeus lectin I.*

# MARKERS PER LE CELLULE MUSCOLARI

- DESMINA: reagisce in cellule con differenziazione per muscolo liscio e con i relativi tumori, ma anche con alcuni sottotipi di rabdomiosarcoma. E' presente nei miofibroblasti, ma non nelle cellule mioepiteliali.*
- ACTINA MUSCOLARE (HHF35): reagisce sia con muscolatura liscia che scheletrica ed è espressa sia da miofibroblasti che da cellule mioepiteliali. Può colorare anche l'istiocitoma fibroso.*
- MIOGENINA (MyoD1): fattore di trascrizione miogenico, espresso negli stadi precoci della differenziazione muscolare scheletrica. Reattività presente nella gran parte di tutti i tipi di rabdomiosarcoma.*
- MIOGLOBINA E  $\alpha$ -SARCOMERIC ACTIN: per rabdomiosarcomi.*
- ACTINA PER MUSCOLO LISCIO: per leiomiosarcomi.*

# MARKERS NEUROGLIALI

**-PROTEINA GLIALE FIBRILLARE ACIDA (GFA):** filamento intermedio presente in cellule gliali e nei tumori derivati con l'eccezione degli oligodendrogliomi. Reagisce anche con tumori delle ghiandole salivari.

**-NEUROFILAMENTI (NF):** sono 3 proteine correlate, espresse dai neuroni. La reattività è presente in neoplasie neurali e neuroendocrine (neuromi, ganglioneuromi, ganglioneuroblastomi, paragangliomi, feocromocitomi, carcinoidi, ca. neuroendocrini della cute e del polmone).

**-PROTEINA BASICA DELLA MIELINA (MBP):** reagisce con la mielina periferica e quella centrale. E' positiva in neuromi, neurofibromi, tumori a cellule granulose, sarcomi neurogenici.

**-RECETTORE DEL FATTORE DI CRESCITA PER I NERVI (NGFr):** riconosce un recettore di membrana (p75) presente negli assoni nervosi, nel perinervio e nelle cellule di Schwann. E' positivo nei tumori delle guaine nervose periferiche, ma può essere espresso anche dai melanomi e da altri tumori.

# MARCATORI ENDOCRINI

- **CROMOGRANINA A:** proteina associata ai granuli secretori. Colora la maggior parte delle cellule endocrine normali ed i relativi tumori.
- **SINAPTOFISINA:** proteina componente le membrane delle piccole vescicole sinaptiche. Reagisce con neuroni e cellule endocrine.
- **ENOLASI NEURO-SPECIFICA (NSE):** si studia la subunità  $\gamma$  dell'enolasi espressa in neuroni e cellule neuroendocrine.

## RECETTORI PER ORMONI STEROIDEI

I recettori per gli estrogeni (ER) e per il progesterone (PR) sono recettori per fattori di crescita intranucleari. Con la produzione di anticorpi monoclonali anti ER e PR si è aumentata enormemente la sensibilità per la loro analisi nei tumori.

- **RECETTORE PER GLI ESTROGENI:** in passato si è usato il monoclonale H22, al momento si usa il monoclonale 1D5 che riconosce un epitope dell'N terminale del recettore.

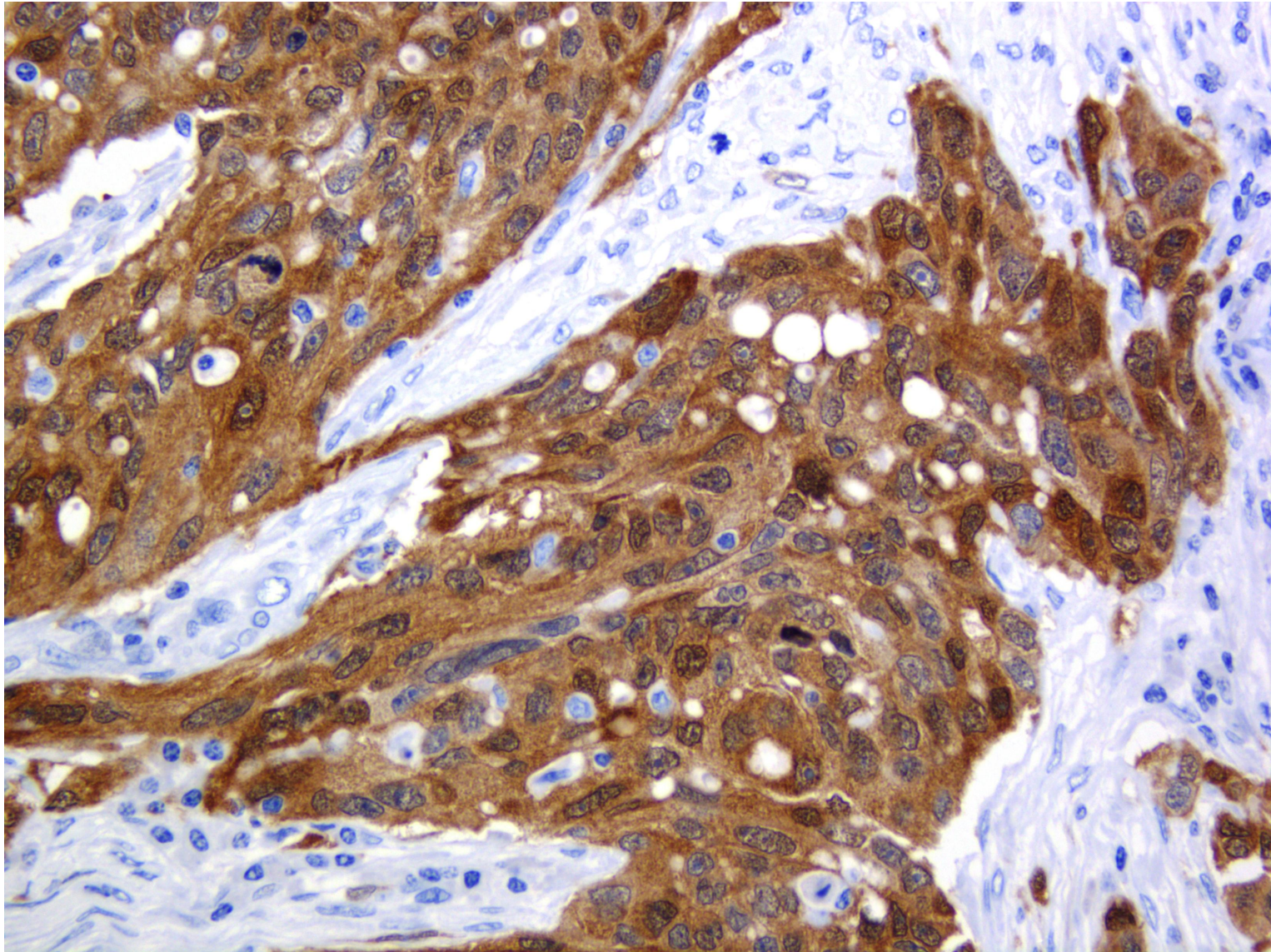


## **MARCATORI DI PROLIFERAZIONE CELLULARE**

- PCNA (Proliferating Cells Nuclear Antigen):** è una proteina associata alla DNA polimerasi, espressa in massimi livelli nella tarda fase G1 e durante la fase S del ciclo cellulare.
- Ki-67 (MIB1):** espresso in tutte le fasi del ciclo cellulare eccetto in G0.

## **MARCATORI DI AGGRESSIVITA' TUMORALE**

- EGFr:** recettore di membrana che lega EGF o TGF $\alpha$  e con attività di tirosinchinasi. Elevata espressione è associata a maggior aggressività.
- C-erbB2 (HER2 / neu):** oncogene codificante un recettore di membrana simile ad EGFr. In molti tumori maligni il gene è amplificato o iperespresso. Nei tumori mammari questa iperespressione è legata ad una prognosi peggiore (FISH-Herceptin)
- P53:** una mutazione della p53 è uno degli eventi più comuni nel cancro, le proteine mutate sono più stabili e non essendo degradate si accumulano a livello nucleare. Così possono essere messe in evidenza con metodi immunoistochimici. Nei tessuti normali la p53 è al di sotto della soglia rilevabile.



P53 in HGSO carcinoma