



# Ricerca della clonalità nelle patologie linfoproliferative del cane

**Genefast**

**genetic solutions**

Soluzioni biotecnologiche e genetiche applicate alla diagnostica molecolare veterinaria e all'industria alimentare.

Data: luglio 2007

Anno 2 Numero 1

Genefast  
Via della Pace 33/a  
41050 Castelnuovo Rangone  
Modena  
Tel.: +39 59 536710  
Fax: +39 59 536710  
www.genefast.com  
E-mail: info@genefast.com

## La clonalità come marker molecolare di neoplasia linfoide

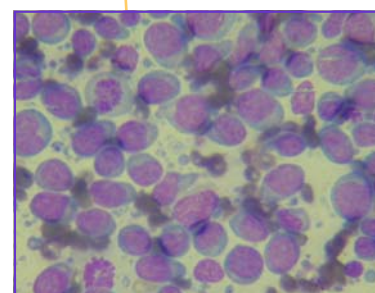
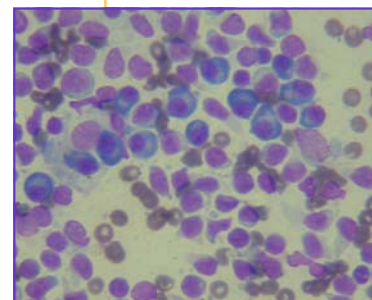


Le neoplasie linfoidi rappresentano circa il 25% di tutte le neoplasie canine. La diagnosi di linfoma o leucemia viene generalmente effettuata tramite valutazione citomorfologica associata a tecniche di immunofenotipizzazione. Tuttavia, le neoplasie linfoidi pongono, talvolta, il clinico ed il patologo di fronte ad un dilemma diagnostico, soprattutto nello stadio iniziale della patologia o durante proliferazioni linfocitarie mature, quando la distinzione tra una neoplasia incipiente ed uno stato di iperplasia reattiva può risultare estremamente problematica. Inoltre, l'utilizzo preferenziale di tecniche poco invasive nella fase iniziale dei protocolli diagnostici cli-

nici, (aspirazione con ago sottile o biopsie guidate), determina spesso la presenza di materiale diagnostico scarso per quantità e/o qualità, creando un'ulteriore difficoltà di interpretazione.

In tutti quei casi in cui la morfologia e le tecniche immunopatologiche non risultino esaustive dal punto di vista diagnostico, è ora possibile utilizzare anche in medicina veterinaria tecniche molecolari in grado di identificare una neoplasia linfoide in modo più oggettivo ed accurato\* valutando la clonalità.

\*Burnett et al, 2003



## Cos'è la clonalità

Come noto, una neoplasia linfoide è costituita da una popolazione cellulare con identiche caratteristiche, derivata dalla proliferazione di un unico precursore comune e per questo definita clonale; pertanto, tutte le cellule tumorali contengono un'identica sequenza di DNA che può essere utilizzata come marker specifico della neoplasia. La ricerca della clonalità nelle neoplasie linfoidi canine (linfomi e leucemie) eseguita con metodiche di biologia molecolare è volta alla ricerca di riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici ed è in grado di individuare una popolazione clonale anche quando questa rappresenta l'1% della totalità cellulare.

**La ricerca della clonalità rappresenta pertanto un valido supporto per il clinico ed il patologo in tutti quei casi in cui la differenziazione tra uno stato infiammatorio ed uno stato neoplastico risulti difficoltosa.**



## Principio dell'analisi

L'analisi della clonalità nelle neoplasie linfoidi canine riguarda la ricerca dei riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici (BCR e TCR).

La regione variabile delle immunoglobuline e del TCR, è caratterizzata da un'enorme variabilità strutturale necessaria per il riconoscimento antigenico. Tale variabilità è ottenuta fisiologicamente attraverso il riarrangiamento dei geni che codificano per tale regione, che combinandosi casualmente tra loro generano un'estesa diversità del dominio variabile delle Ig e del TCR ed in modo tale che ogni linfocita è caratterizzato da un riarrangiamento che lo contraddistingue da tutti gli altri. Le cellule neoplastiche derivanti dall'espansione clonale del precursore saranno tutte caratterizzate dallo stesso riarrangiamento.

La regione genica di interesse viene amplificata tramite PCR utilizzando primer specifici per il TCR e il BCR.

I risultati ottenuti sono normalmente visualizzati con tecniche differenti. Il laboratorio Genefast utilizza invece dei normali gel di poliacrilamide, la tecnica di genescanning su sequenziatore automatico.

In tal modo è possibile identificare patterns monoclonali, tipici dei linfomi, da patterns oligo o policlonali in modo estremamente sensibile e specifico. Tale tecnica consente di discriminare patologie neoplastiche linfoidi da iperplasie reattive anche nel caso siano sostenute da agenti come Ehrlichia spp o Leishmania spp.

\*Burnett et al, 2003

## Sensibilità della metodica

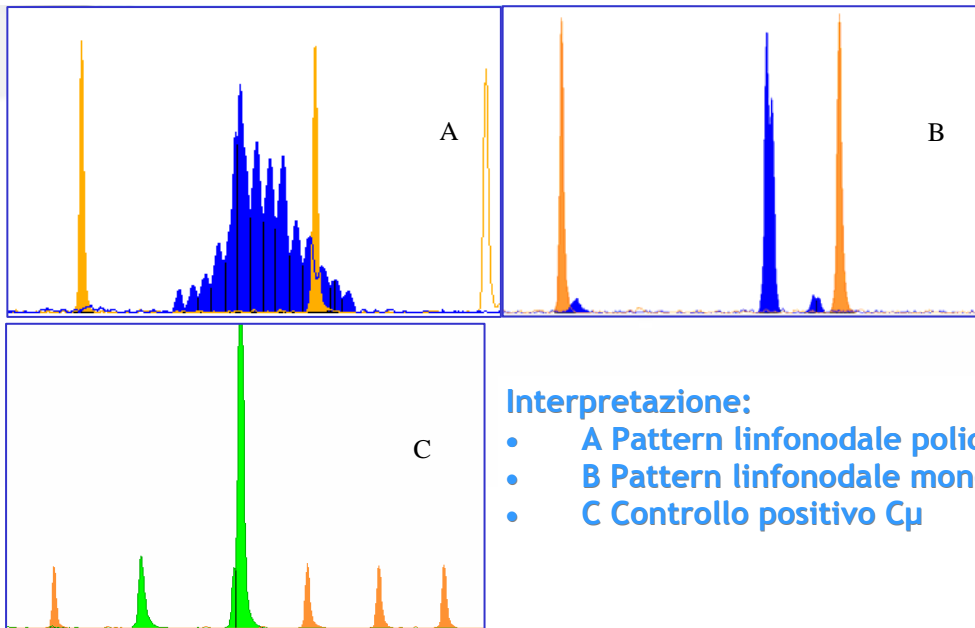
L'analisi dei riarrangiamenti genici dei recettori antigene-specifici ha dimostrato una sensibilità del 90% nel rilevare la presenza di una popolazione clonale neoplastica\*. Secondo alcuni autori\*\*, i risultati falsi negativi potrebbero essere attribuibili alla presenza di mutazioni genetiche sulla sequenza d'interesse a causa di traslocazioni cromosomiche o riarrangiamenti genici parziali.

Risultati falsi positivi o falsi negativi sono legati in ogni caso all'interpretazione dei risultati dopo visualizzazione su gel. In alcuni casi stabilire se la popolazione in esame è monoclonale o policlonale può risultare difficile. Tale considerazione è soprattutto valida per il TCR, che fisiologicamente è caratterizzato da una minor variabilità genetica intrinseca risultando in pattern oligoclonali/monoclonali anche in corso di patologie iperplastiche. La possibilità di utilizzare tecniche di elettroforesi e visualizzazione più sensibili, determina un incremento nella possibilità di individuare una popolazione clonale neoplastica.

**Il Laboratorio Genefast, in collaborazione con L'Università di Bologna, ha validato la metodica PCR per la ricerca dei riarrangiamenti genici clonali dei recettori antigene-specifici su oltre 100 casi di linfoma canino, applicando l'analisi di Genescanning.**



A differenza dei comuni gel di poliaccrilamide, l'elettroforesi capillare è in grado di distinguere prodotti di amplificazione che differiscono di un singolo nucleotide. I prodotti dell'analisi di frammento appaiono come picchi di altezza ed area diversa in dipendenza della quantità del prodotto e del peso, che viene calcolato dal software rispetto allo standard di riferimento. La presenza di un prodotto derivato da riarrangiamento genico clonale dei recettori antigene-specifici, appare pertanto come un picco a base molto stretta (indicazione di clonalità); la presenza di un prodotto derivato da una popolazione policlonale e quindi costituito da diversi riarrangiamenti genici, viene visualizzato come un rilievo a base molto larga senza la prevalenza di un picco.



#### Interpretazione:

- **A Pattern linfonodale policlonale**
- **B Pattern linfonodale monoclonale**
- **C Controllo positivo C<sub>μ</sub>**

## Quando richiedere l'esame

- In tutti i casi in cui le metodiche diagnostiche tradizionali non siano in grado di escludere la presenza di una popolazione neoplastica linfocitaria:
  - Proliferazioni linfocitarie mature
  - Stati iperplastici complessi
  - Sospetto di neoplasia incipiente
  - Gammopatie di difficile classificazione all'elettroforesi sierica

## Matrici

Il materiale biologico da cui estrarre il DNA deve essere di buona qualità. L'analisi può essere effettuata comunque su qualsiasi tessuto patologico (midollo osseo, linfonodo, fegato etc) anche fissato in formalina o incluso in paraffina.

Liquidi patologici, aspirati, impronte, qualsiasi preparato citologico fresco, fissato e colorato colorato o congelato.

Poiché, in caso di errori di campionamento (cioè ad esempio aghi aspirati sottili senza matrice patologica) il saggio può risultare falsamente negativo, è essenziale accertarsi della presenza della popolazione linfoide da esaminare nella matrice inviata. Ad esempio è possibile dividere in 2 parti il prelievo biotico, e sottoporre una a valutazione istomorfologica e l'altra a valutazione molecolare. Analogamente, in caso di agoaspirati è opportuno inviare al laboratorio o valutare direttamente anche un preparato colorato con metodiche tradizionali.