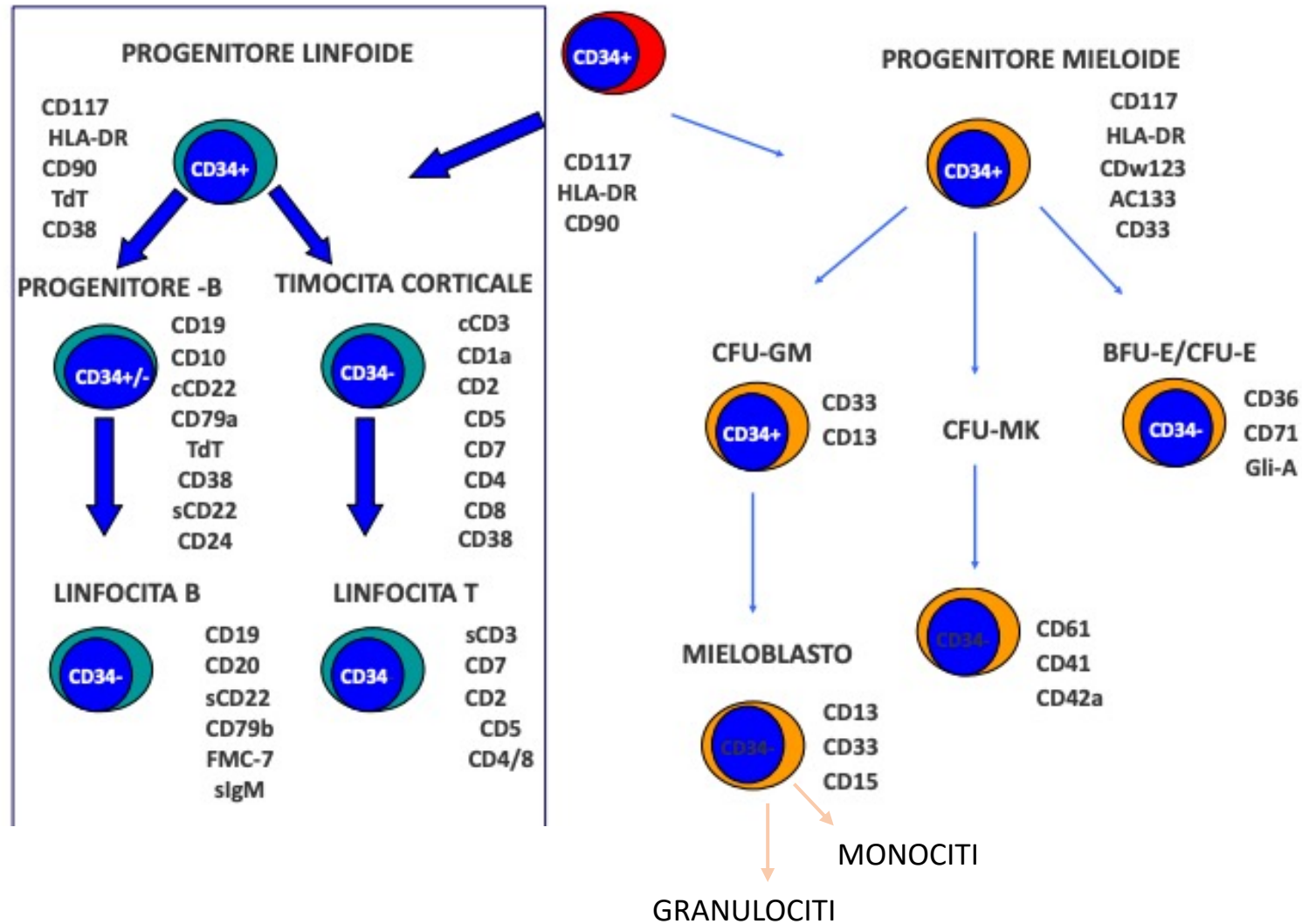


**IMMUNOFENOTIPO  
CITOMETRIA A FLUSSO**

- **POSSIBILITÀ DI IMPIEGARE 4-6-8-10-12... COLORI**
- **POSSIBILITÀ DI ANALIZZARE SANGUE INTERO PERIFERICO, MIDOLLARE, LIQUOR, VERSAMENTI**
- **POSSIBILITÀ DI STUDIARE CONTEMPORANEAMENTE ANTIGENI DI SUPERFICIE E INTRACITOPLASMATICI E NUCLEARI**

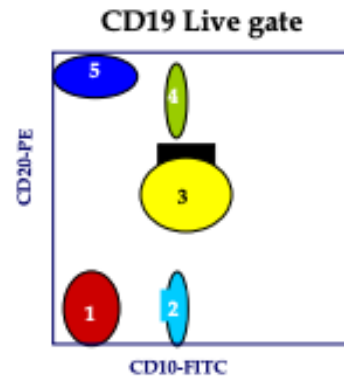
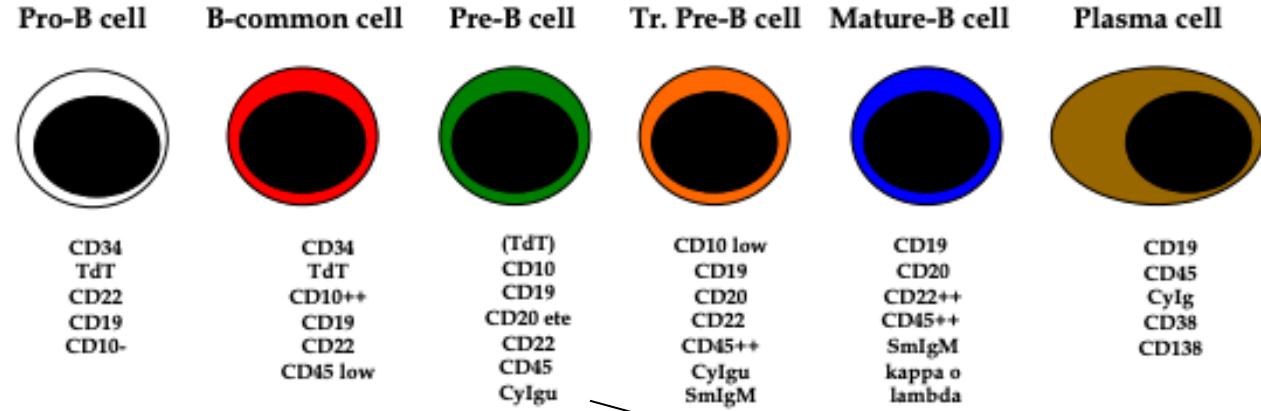
## CELLULA STAMINALE



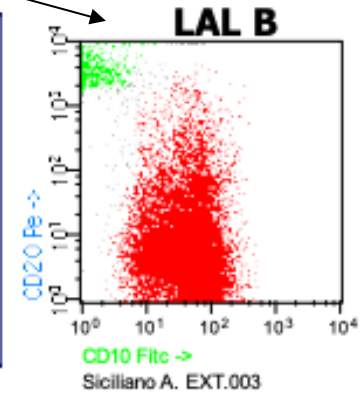
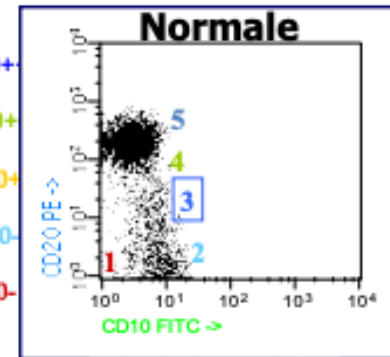
CFU-MK= precursore megacariociti

BFU-E/CFU-E= progenitori eritroidi

# DIFFERENZIAZIONE CELLULA B



- 5 - CD19+/CD10-/CD20+
- 4 - CD19+/CD10+/CD20+
- 3 - CD19+/CD10+/CD20-
- 2 - CD19+/CD10+/CD20-
- 1 - CD19+/CD10-/CD20-



# MATURAZIONE MIELOIDE:

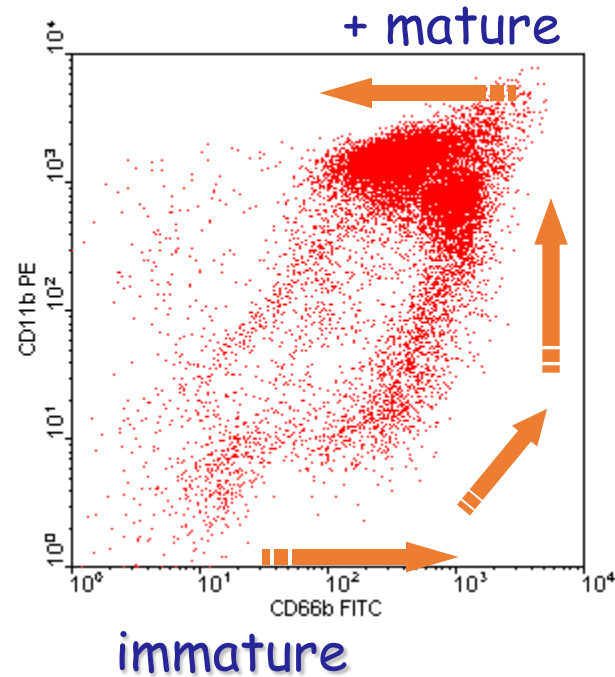
## granulocitopoiesi

	stem cell	Blasto mieloide	promiel ocita	Mielo cita	Meta mielocita	granulo cita
CD34						
CD13						
CD33						
CD66c						
CD66b						
CD11c						
CD11b						
CD11a						
CD16						
CD64						
CD15						

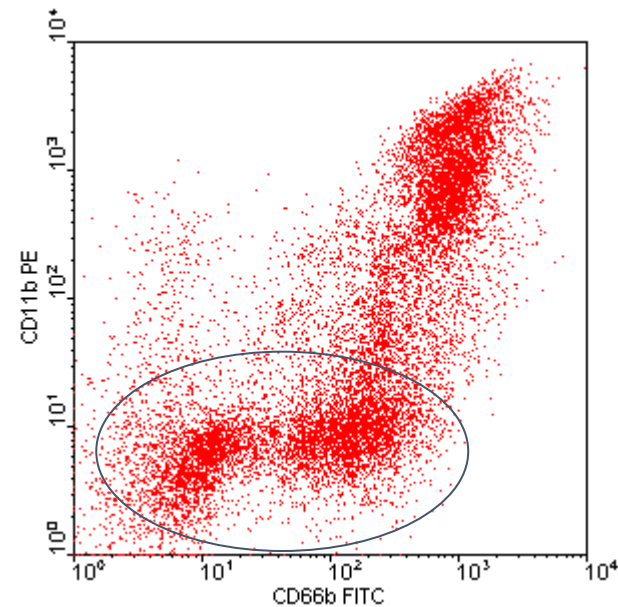
# Maturazione Mieloide

## Interpretazione su CD66b/CD11b

BM normale

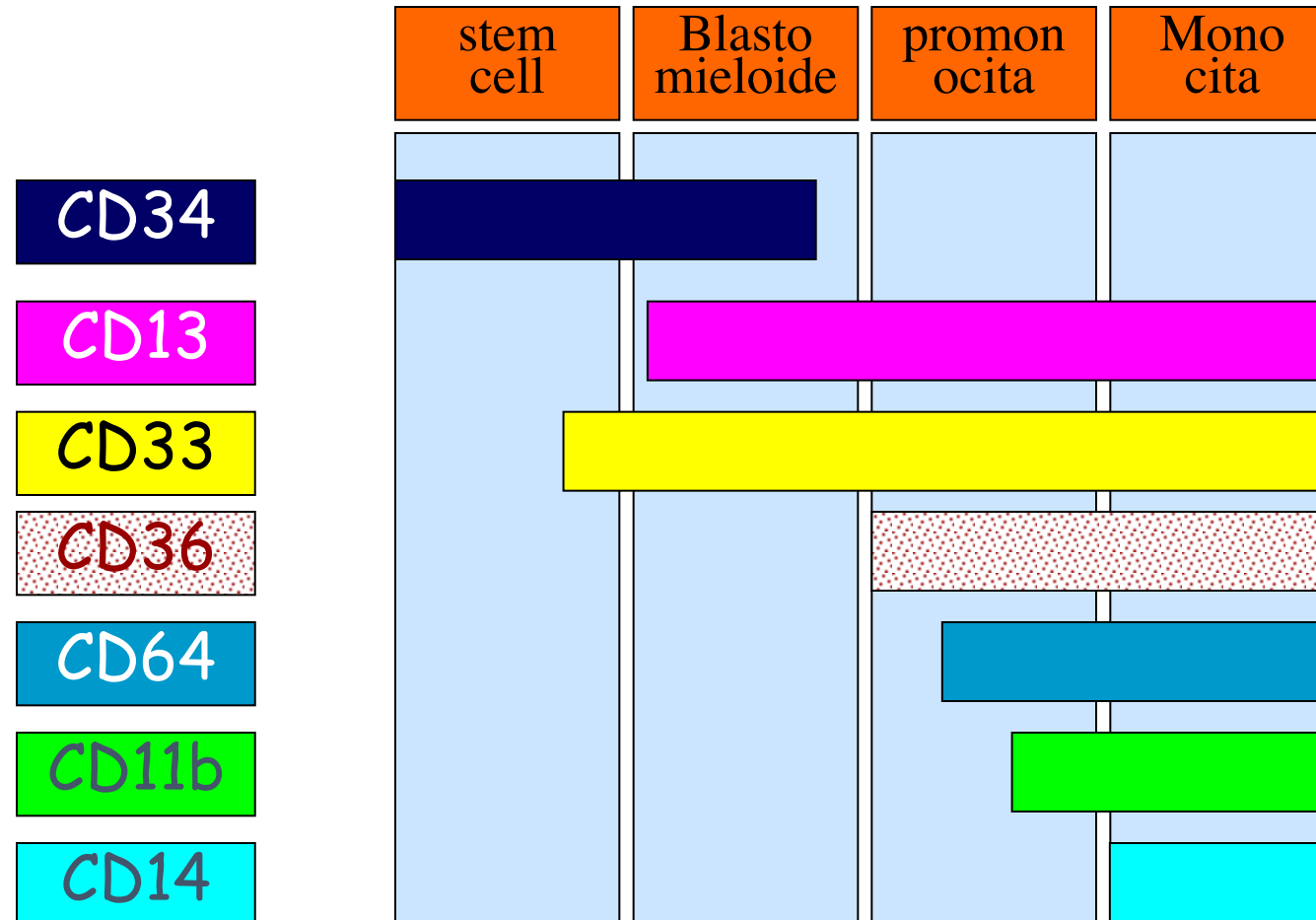


BM con blocco maturativo

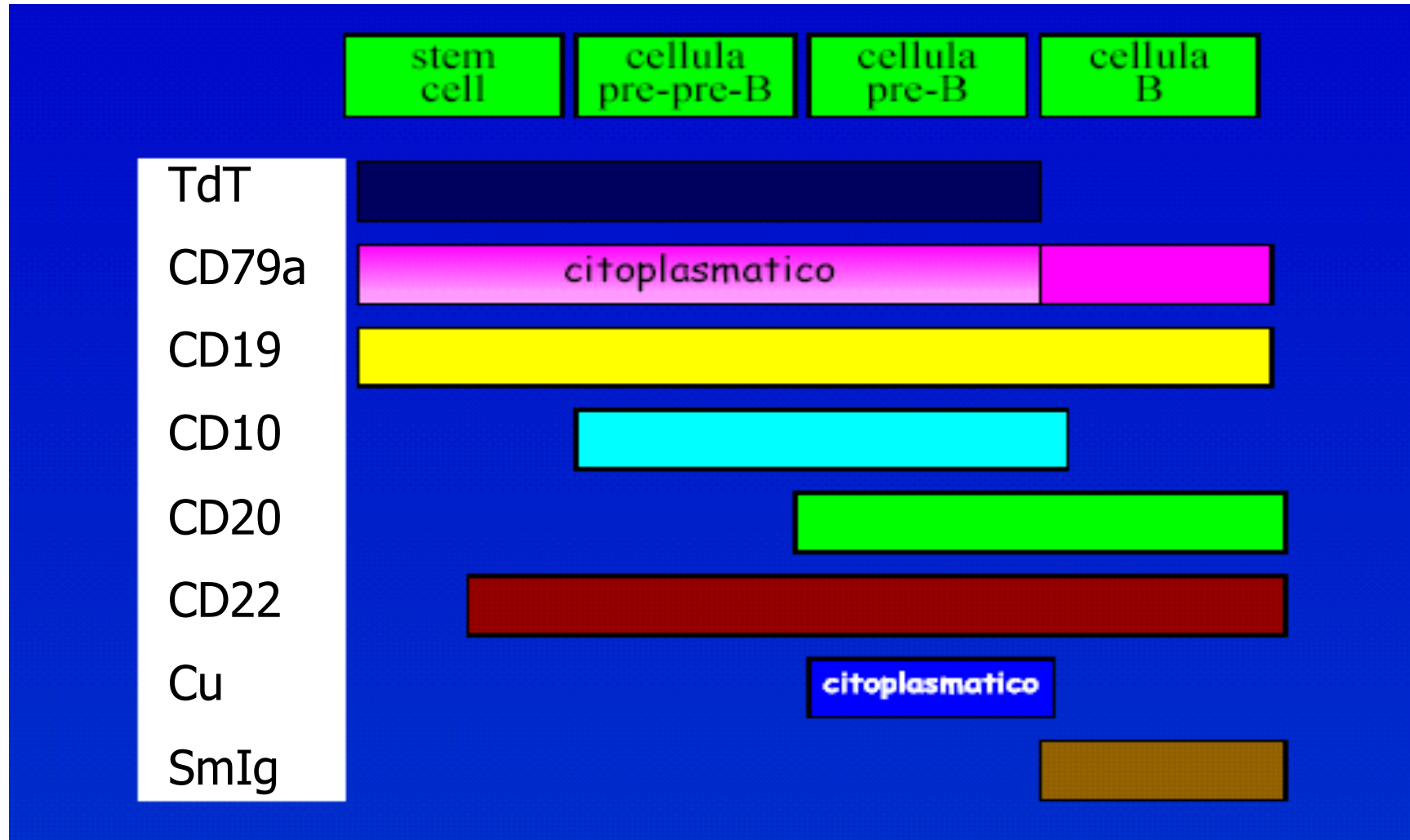


# MATURAZIONE MIELOIDE

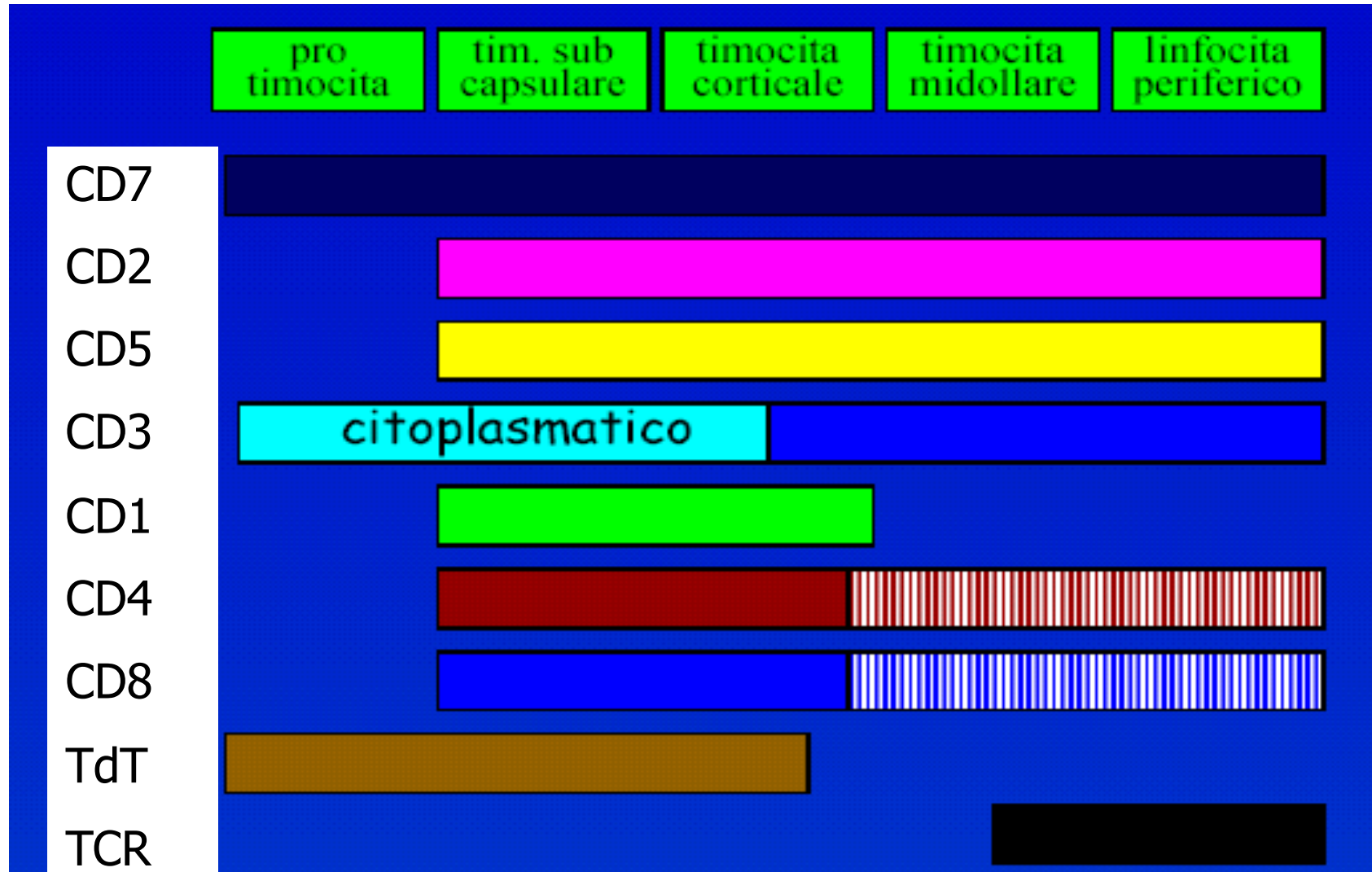
## monocitopoiesi



# Marcatore B-lineage



# Marcatori T-lineage





Le leucemie (specialmente quelle acute) derivano da alterazioni molecolari presenti a livello di un precursore ematopoietico.

### GENI COINVOLTI

**ONCOGENI:** i prodotti di tali geni promuovono positivamente la proliferazione cellulare.

**ONCOSOPPRESSORI:** i prodotti di tali geni inibiscono la proliferazione cellulare.

## Geni di Fusione

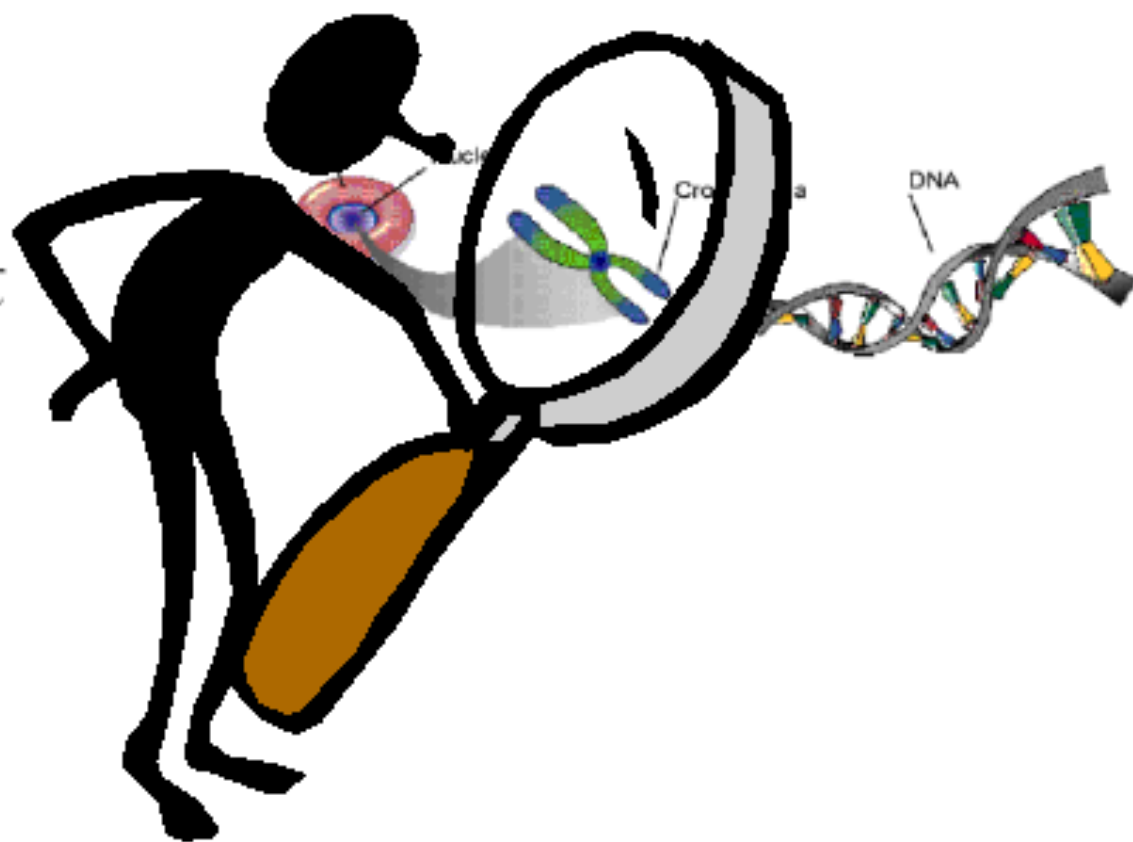
- Si definiscono **geni di fusione** gli oncogeni associati a traslocazioni cromosomiche specifiche, generati dalla ricombinazione tra due geni.

# Traslocazioni nelle Leucemie Acute

Patologia	Traslocazione	Geni coinvolti
M2	t(8;21)	<i>ETO-AML1</i>
M2 & M4	t(6;9)	<i>DEK-CAN</i>
M3	t(15;17)	<i>PML-RAR<math>\alpha</math></i>
M4	inv(16)	<i>CBF<math>\beta</math>-MYH11</i>
B-ALL	t(9;22)	<i>BCR-ABL</i>
	t(1;19)	<i>E2A-PBX1</i>
	t(17;19)	<i>HLF-E2A</i>
	t(12;21)	<i>TEL-AML-1</i>
	t(4;11)	<i>AF4-MLL</i>
T-ALL	t(8;14)	<i>MYC-IgH</i>
	TAL deletion	<i>TAL</i>
	t(1;14)	<i>TAL-1-TCR<math>\delta</math></i>
	t(10;14)	<i>HOX11-TCR<math>\alpha</math></i>
	t(11;14)	<i>11p13- TCR<math>\delta</math></i>

# La Citogenetica Classica

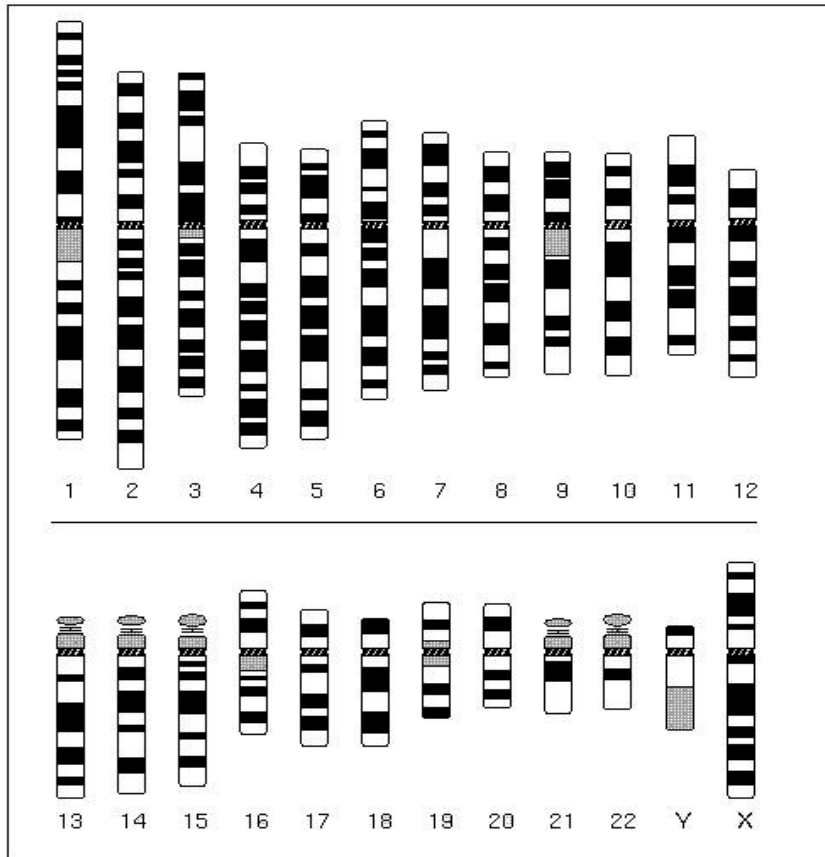
☛ Permette di  
identificare  
riarrangiamen  
ti cromosomici  
coinvolgenti  
non meno di 5  
Mb.



# *BANDEGGIAMENTO CROMOSOMICO*

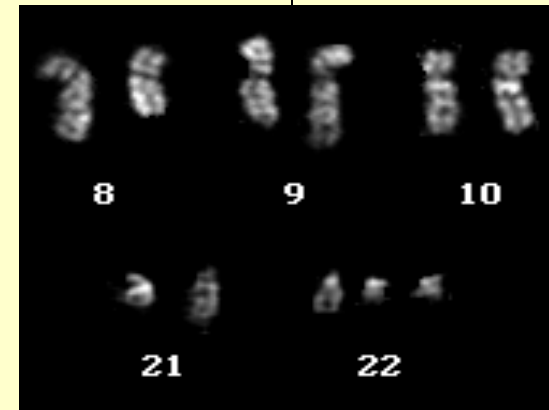
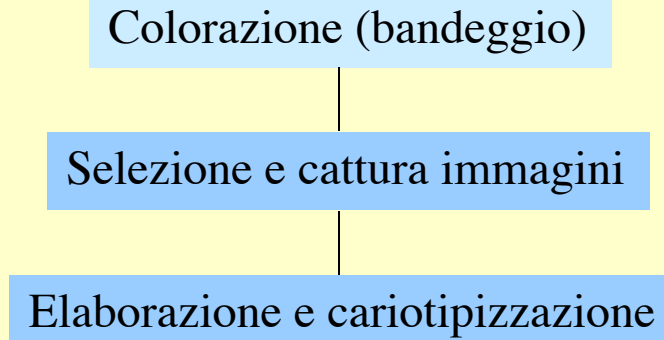
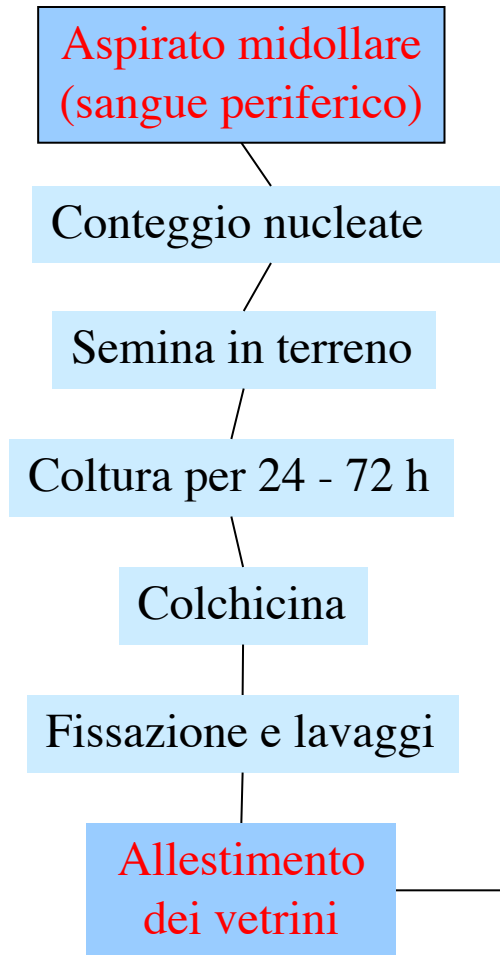
Lo sviluppo del bandeggiamento (Caspersson, 1968 ) ha costituito un progresso decisivo per le analisi citogenetiche e ha permesso di individuare singoli cromosomi.

Vari trattamenti denaturanti consentono di colorare cromosomi, dando in modo riproducibile una sequenza di bande chiare e scure.



Il numero del cromosoma è seguito da p (braccio corto) o q (braccio lungo) e dal numero della banda, esempio **11q23** significa, l'estremità del braccio lungo q del cromosoma 11, banda 2 sottobanda 3.

## Cariotipo Convenzionale (CC)

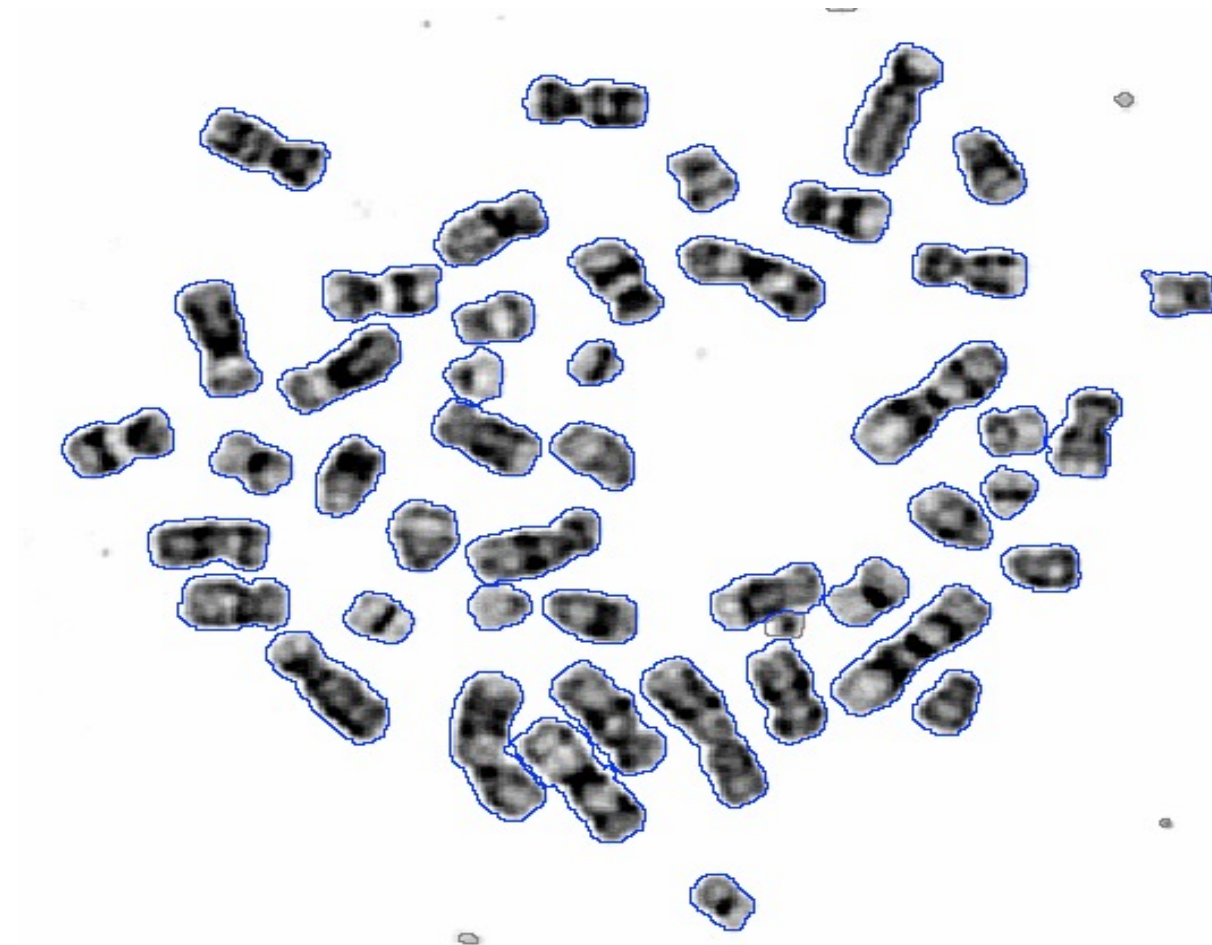


Conclusione diagnostica

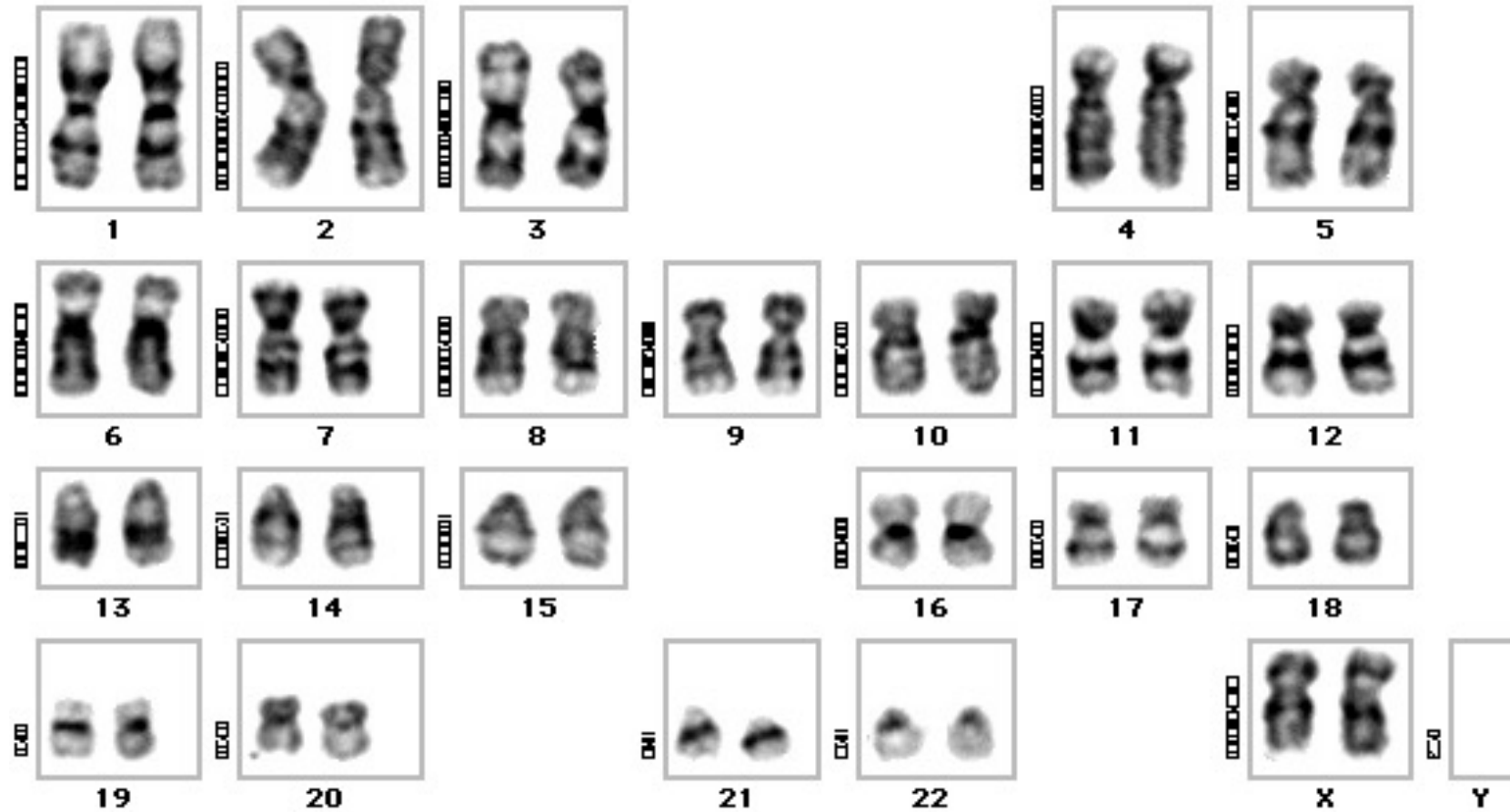
BandeGGio GTG (G-Trypsin-Giemsa):

- E' uno dei bandeGGi più largamente utilizzati. Consiste nel trattare i cromosomi con un enzima proteolitico, la tripsina, che digerisce le proteine istoniche.
- In seguito si immergono i vetrini in una soluzione di Giemsa, una miscela di azur II ed azur II eosina, e questo consente la visualizzazione delle bande cosiddette G.

METAFASE DA  
ORDINARE



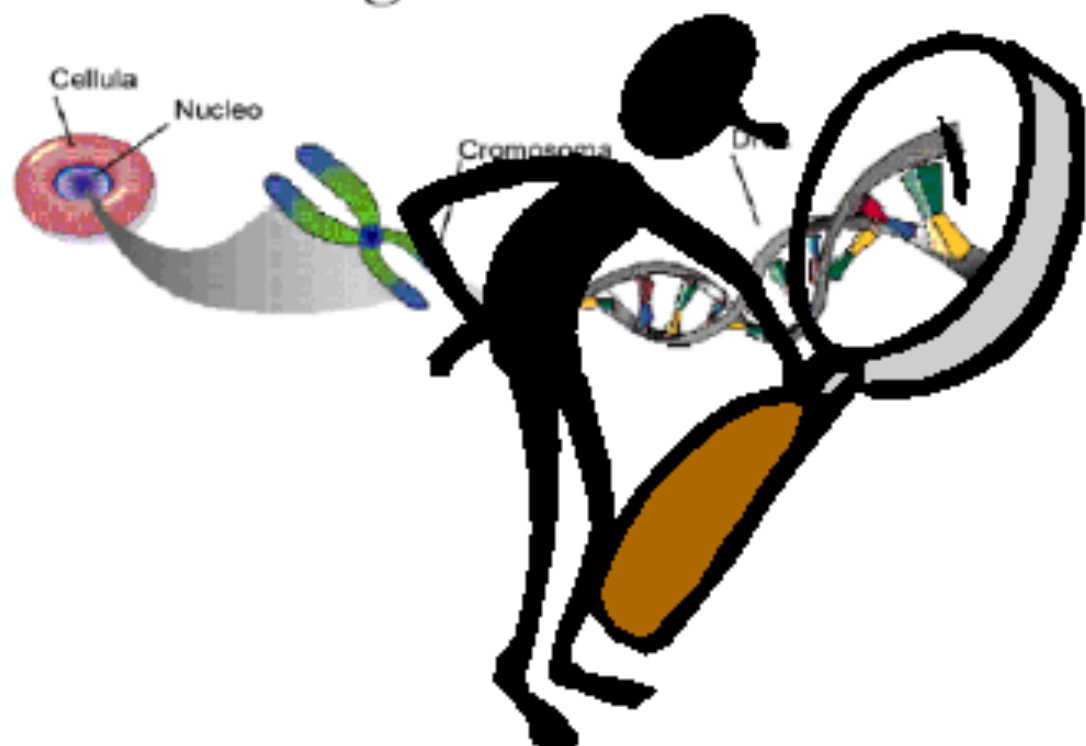
## CARIOTIPO COSTITUZIONALE: METAFASE ORDINATA



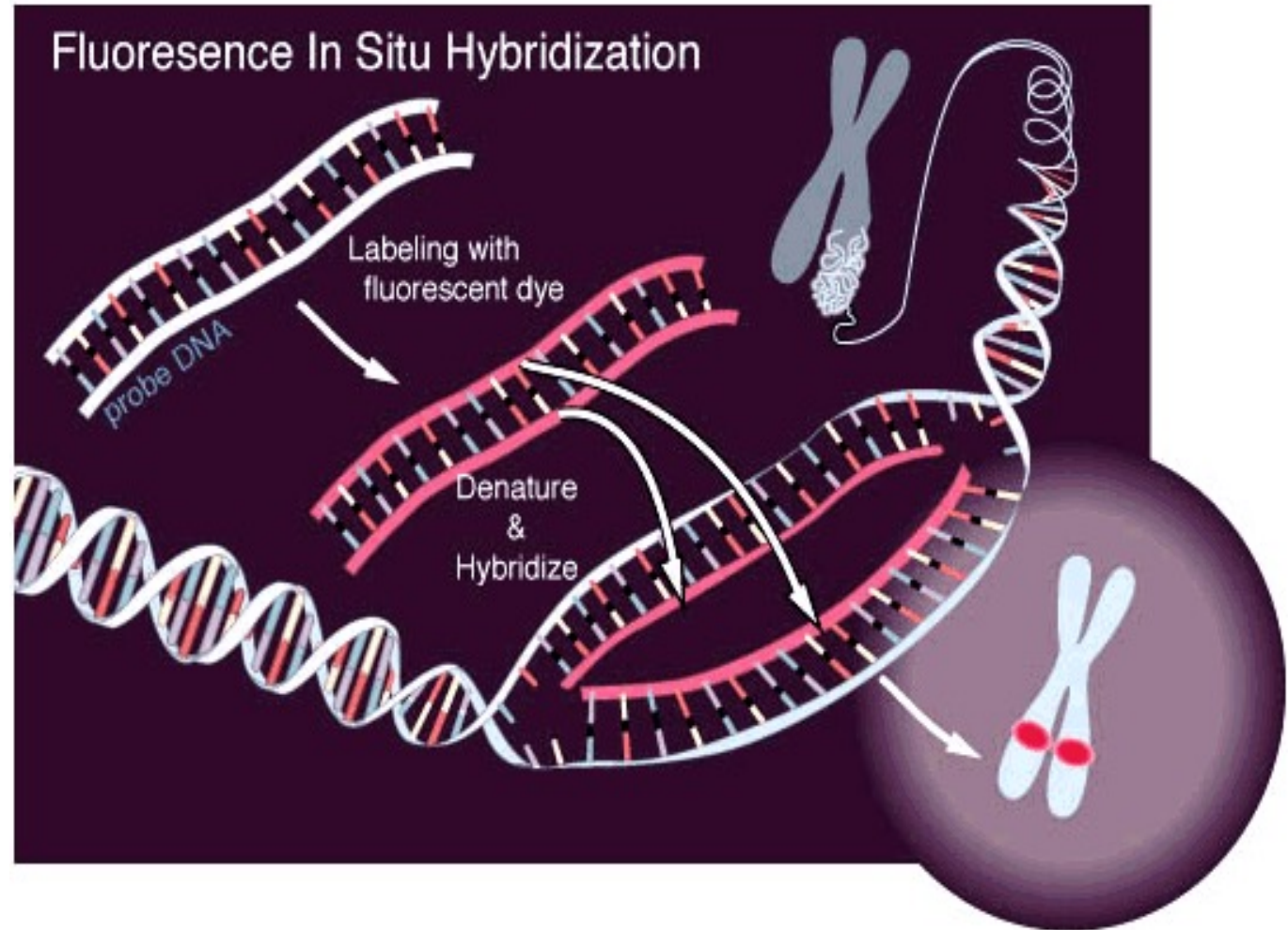


# **La Citogenetica Molecolare**

**Abbina la possibilità di un'analisi del DNA, propria delle tecniche di biologia molecolare, con la struttura cromosomica il cui studio è oggetto della citogenetica classica.**

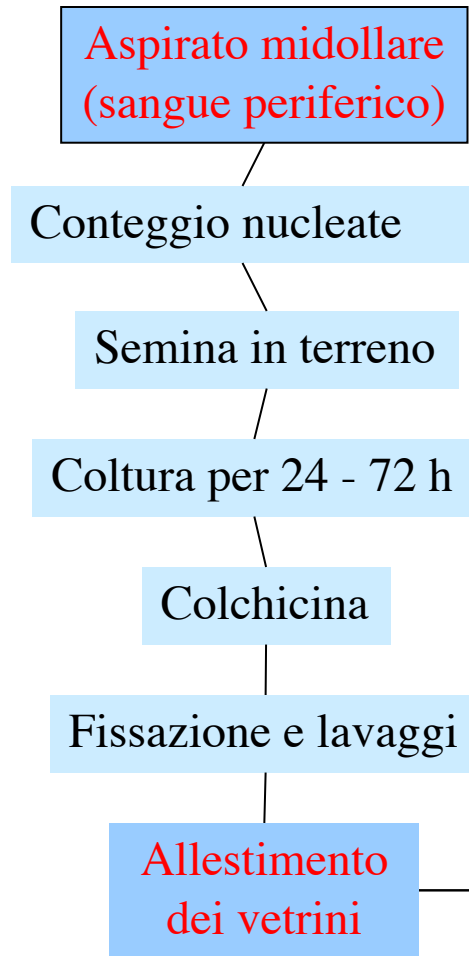


Permette un'analisi mirata di una regione cromosomica consentendo di mettere in evidenza riarrangiamenti di alcune centinaia di chilobasi.

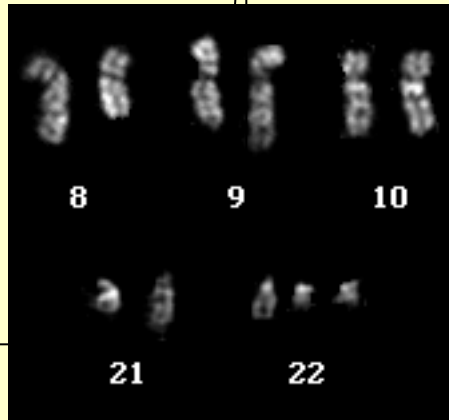
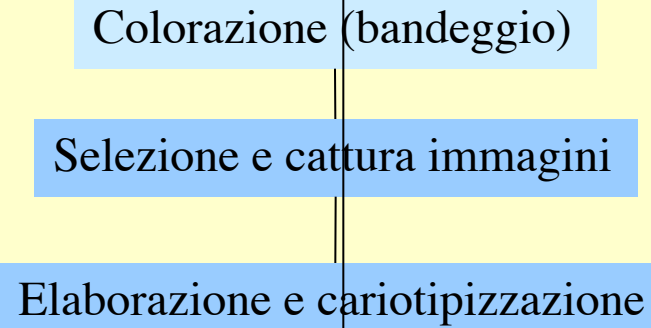


Tale identificazione avviene mediante sonde marcate impiegando fluorocromi che emettono a diverse lunghezze d'onda.

La FISH consente di ottenere una maggiore precisione diagnostica

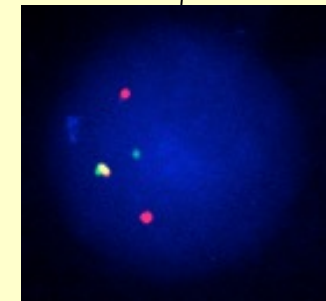
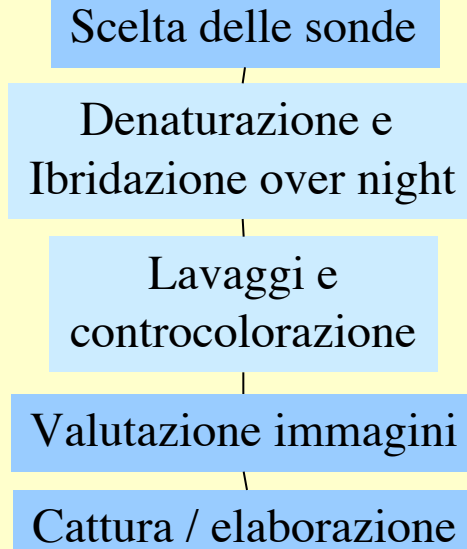


## Cariotipo Convenzionale (CC)



Conclusione diagnostica

## Ibridazione in Situ (FISH)



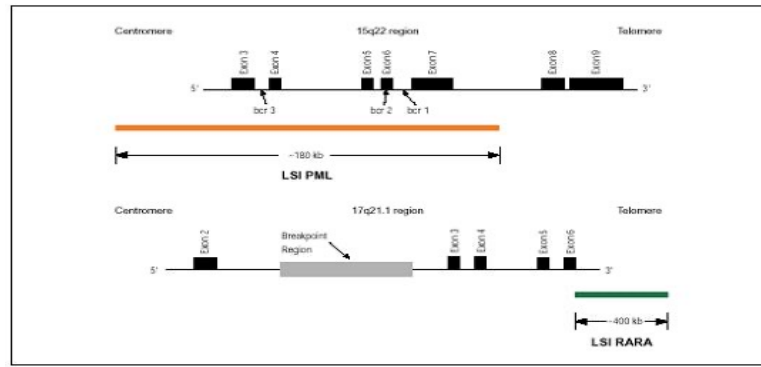
Conclusione diagnostica

## SONDE:

- **Sonde locus-specifiche:** sono sonde molto piccole che riconoscono porzioni corte del cromosoma; vengono utilizzate per evidenziare aberrazioni che coinvolgono un gene o una parte di esso.
- **Sonde chromosome painting:** riconoscono sequenze specifiche per ogni singolo cromosoma localizzate lungo tutto il suo asse; il cromosoma appare interamente colorato.
- **Sonde centromeriche (o alfoidi):** riconoscono brevi sequenze centromeriche di DNA altamente ripetitive, specifiche per ciascun cromosoma.
- **Sonde telomeriche:** sono utili nell'identificazione di traslocazioni che coinvolgono le regioni telomeriche.

## SONDA (LSI) DOPPIO COLORE PER t(PML /RAR $\alpha$ )

Lab.Oncoematologia  
Pediatria (BO)



### DESCRIZIONE

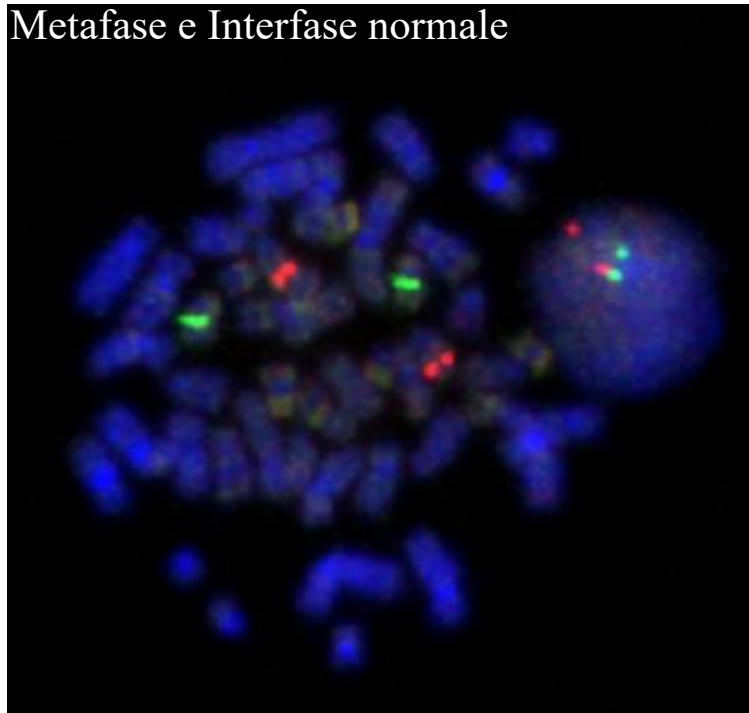
METAFASE e INTERFASE NORMALI,  
MOSTRANO: 4 SEGNALE

DUE VERDI (RAR  $\alpha$  regione 17q21,1)

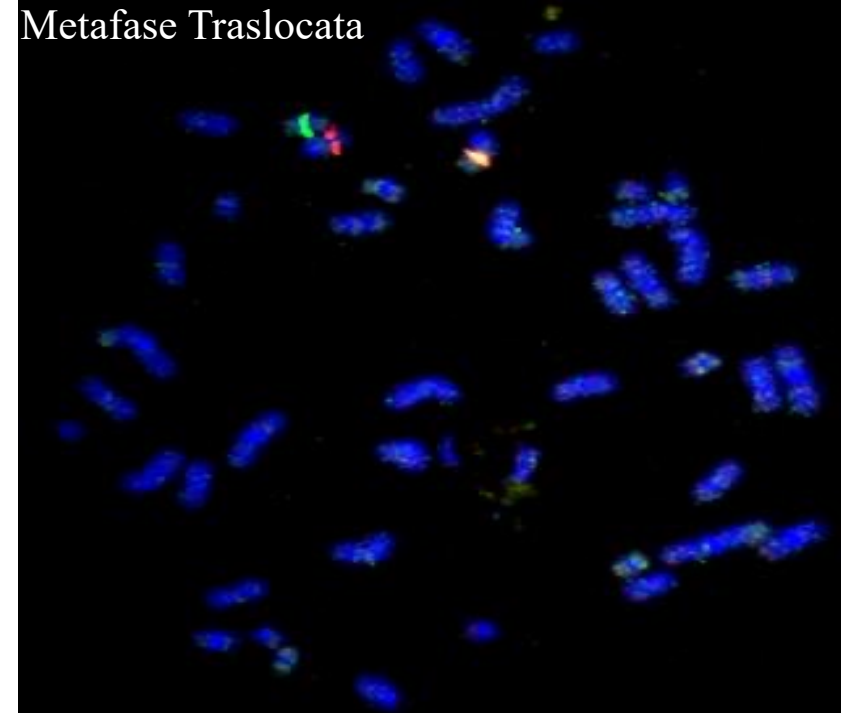
DUE ROSSI (PML regione 15q22).

METAFASE TRASLOCATA, MOSTRA: UN  
SEGNALE VERDE (RAR  $\alpha$ ) UNO ROSSO (PML) e  
UN SEGNALE DI FUSIONE DEI DUE GENI  
GIALLO/BIANCO (PML-RAR  $\alpha$ )

Metafase e Interfase normale



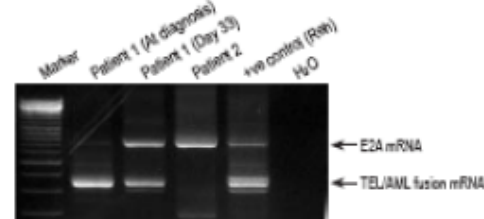
Metafase Traslocata



## Diagnostica Molecolare per LAM (routine) – cerca trascritti di fusione per PCR

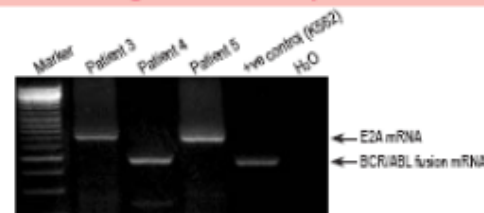
Chromosomal Alteration	Genes Involved	Fusion Gene	Multiplex No.
t(X;11)(q13;q23)	MLL (11q23); AFX (Xq13)	MLL/AFX	R1
t(6;11)(q27;q23)	MLL (11q23); AF6 (6q27)	MLL/AF6	R1
t(11;19)(q23;p13.1)	MLL (11q23); ELL (19p13.1)	MLL/ELL	R1
inv(16)(p13q22)	CBF (16q22); MYH11 (16p13)	CBF/MYH11	R1
t(1;11)(p32;q23)	MLL (11q23); AF1p (1p32)	MLL/AF-qp; MLL/AF-1p	R2
t(10;11)(p12;q23)	MLL (11q23); AF10 (10p12)	MLL/AF10	R2
dup MLL (11q23)	MLL (11q23); MLL (11q23)	MLL/MLL	R2
t(11;17)(q23;q21)	MLL (11q23); AF17 (17q21)	MLL/AF17	R2
TAL1D	SIL (1p34); TAL1 (1p34)	SIL/TAL1	R3
t(1;19)(q23;p13)	E2A (19p13); PBX1 (1q23)	E2A/PBX1	R3
t(12;21)(p13;q22)	TEL (12p13); AML1 (21q22)	TEL/AML1	R3
t(17;19)(q22;p13)	E2A (19p13); HLF (17q22)	E2A/HLF	R3
t(3;21)(q26;q22)	AML1 (21q22); MDS1 (3q26) (EVI1) (3q26)	AML1/MDS1(EVI1)	R4
t(8;21)(q22;q22)	AML1 (21q22); ETO (8q22)	AML/ETO	R4
t(16;21)(p11;q22)	TLS (16p11); ERG (21q22)	TLS/ERG	R4
t(1;11)(q21;q23)	MLL (11q23); AF1q (1q21)	MLL/AF1q	R5
t(9;11)(p22;q23)	MLL (11q23); AF9 (9p22)	MLL (11q23)	R5
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL (11q23); ENL (19p13.3)	MLL/ENL	R5
t(4;11)(q21;q23)	MLL (11q23); AF4 (4q21)	MLL/AF4	R5
t(5;12)(q33;p13)	TEL (12p13); PDGFR (5q33)	TEL/PDGFR	R6
t(9;12)(q34;p13)	TEL (12p13); ABL (9q34)	TEL/ABL	R6
t(9;22)(q34;q11)	BCR (22q11); ABL (9q34)	BCR/ABL	R6
t(6;9)(p23;q34)	DEK (6p23); CAN (9q34)	DEK/CAN	R7
?t(9;9)	SET (9q34); CAN (9q34)	SET/CAN	R7
t(11;17)(q23;q21)	PLZF (11q23); RARA (17q21)	PLZF/RARA	R8
t(15;17)(q21;q22)	PML (15q21); RARA (17q21)	PML/RARA	R8
t(2;5)(p23;q35)	NPM (5q35); ALK (2p23)	NPM/ALK	R8
t(3;5)(q25.1;q34)	NPM (5q35); MLF1 (3q25.1)	NPM/MLF1	R8
t(5;17)(q35;q22)	NPM (5q35); RARA (17q21)	NPM/RARA	R8

### TEL/AML1 gene fusion multiplex RT-PCR



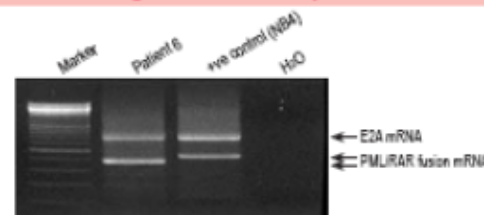
Patient 1: positive for TEL/AML1 gene fusion  
Patient 2: negative for TEL/AML1 gene fusion

### BCR/ABL gene fusion multiplex RT-PCR



Patient 3: negative for BCR/ABL gene fusion  
Patient 4: positive for BCR/ABL gene fusion  
Patient 5: negative for BCR/ABL gene fusion

### PML/RAR gene fusion multiplex RT-PCR



Patient 6: positive for PML/RAR gene fusion



N.B: Oltre alle alterazioni citogenetiche maggiori, nelle LAM si riscontrano spesso mutazioni puntiformi di alcuni geni

Examples of recurrent AML mutations by functional group

Functional class	Specific example mutations
Signaling and kinase pathway	<i>FLT3, KRAS, NRAS, KIT, PTPN11, and NF1</i>
Epigenetic modifiers (DNA methylation and chromatin modification)	<i>DNMT3A, IDH1, IDH2, TET2, ASXL1, EZH2, and MLL/KMT2A</i>
Nucleophosmin	<i>NPM1</i>
Transcription factors	<i>CEBPA, RUNX1, and GATA2</i>
Tumor suppressors	<i>TP53</i>
Spliceosome complex	<i>SRSF2, U2AF1, SF3B1, and ZRSR2</i>
Cohesin complex <sup>*</sup>	<i>RAD21, STAG1, STAG2, SMC1A, and SMC3</i>