

L. SALVAGNO

M.V. FIORENTINO

# I LINFOMI NON-HODGKIN

Prefazione del  
Prof. **Luigi Chicco-Bianchi**  
Direttore dell'Istituto di Oncologia,  
dell'Università degli Studi di Padova

**PICCIN**

## *Aspetti metodologici ed applicativi della citogenetica nelle lesioni linfoproliferative*

*Annarosa Del Mistro, Laura Bonaldi, Roberta Bertorelle, Luigi Chieco-Bianchi*

### INTRODUZIONE

Già all'inizio del secolo era stato ipotizzato che alterazioni cromosomiche potessero essere alla base del processo neoplastico. Nel 1960, Nowell e Hungerford identificarono il cromosoma Philadelphia (Ph<sup>1</sup>) come una alterazione cromosomica associata alla leucemia mieloide cronica (CML)<sup>1</sup>. Questa prima osservazione fu poi seguita, nel 1972, dalla scoperta che circa l'80% dei casi di linfoma di Burkitt (BL) mostravano il marcatore cromosomico 14q+<sup>2</sup>.

Il continuo miglioramento delle metodiche citogenetiche e molecolari ha portato all'intensificarsi delle osservazioni di alterazioni cromosomiche non random, associate a linfomi e leucemie.

In questo capitolo verranno descritte le tappe metodologiche fondamentali in citogenetica e le più frequenti alterazioni cromosomiche, e verranno discussi i limiti e il ruolo della citogenetica nella diagnosi e classificazione delle neoplasie ematopoietiche.

### ASPETTI TECNICI

Le analisi citogenetiche sono effettuabili solo su campioni che contengono cellule vi-

tali, in ciclo. Per questo è estremamente importante che il campione sia trasportato al laboratorio di citogenetica nel più breve tempo possibile dal momento del prelievo. In caso di leucemia, il campione è solitamente ottenuto mediante aspirazione di midollo osseo, e analizzato immediatamente (preparazione diretta) o dopo coltura per 24-48 ore. Il metodo diretto è quello che rispecchia maggiormente la situazione in vivo, anche se una coltura a breve termine mette a volte in evidenza metafasi anormali non osservate nella preparazione diretta. Da evitare invece la coltura a lungo termine, che ha la tendenza a favorire una crescita cellulare selettiva, e può quindi determinare una sotto- o sovra-rappresentazione delle diverse componenti cellulari presenti; non infrequentemente, le cellule con alterazioni cromosomiche (cellule tumorali) hanno uno svantaggio di crescita, che può comportare dei risultati falsi-negativi. Per pazienti che hanno una conta di globuli bianchi maggiore di 10.000/mm<sup>3</sup>, con più del 10% di cellule atipiche, può essere utilizzato un prelievo di sangue periferico. In caso di linfoma, le cellule neoplastiche possono essere ottenute da un linfonodo o da una massa tumorale.

I cromosomi umani sono 46 nelle cellule somatiche: 22 paia di autosomi (identificati

Tabella 1 - Significato dei simboli usati nella nomenclatura citogenetica.

simbolo	significato
p	braccio corto
q	braccio lungo
+	se prima del cromosoma, indica l'acquisizione di un intero cromosoma (es. +8); se dopo il cromosoma, indica acquisizione di parte del cromosoma (es. 14q+, aggiunta di materiale al braccio lungo del cromosoma 14).
-	se prima del cromosoma, indica la perdita di un intero cromosoma (es. -7); se dopo il cromosoma, indica perdita di parte del cromosoma (es. 5q-, perdita di parte del braccio lungo del cromosoma 5).
?	indica incertezza sull'identità del cromosoma o della banda elencata subito dopo il ?.
t	traslocazione
del	delezione
inv	inversione
i	isocromosoma
mar	cromosoma marker
r	cromosoma ad anello

con un numero da 1 a 22) e 2 cromosomi sessuali (identificati con X e Y). Ogni cromosoma ha un braccio corto (designato "p"), un braccio lungo (designato "q"), e una regione centrale (centromero) (vedi Tab. 1 per i simboli in uso in citogenetica).

Le principali fasi della preparazione dei cromosomi per analisi citogenetica consistono in: distruzione del fuso mitotico mediante colchicina, colcemide o agenti analoghi; rigonfiamento delle cellule con una soluzione ipotonica, e stesura dei cromosomi su un vetrino. L'identificazione dei cromosomi viene poi effettuata sia sulla base delle caratteristiche morfologiche (posizione del centromero, lunghezza del cromosoma, presenza di satelliti), che sulla base delle caratteristiche strutturali. L'analisi di queste ultime è resa possibile dall'utilizzo di speciali tecniche di colorazione che inducono la formazione di bande, cioè di segmenti adiacenti chiari e scuri. Le metodiche di bandeggio si dividono in due gruppi principali: 1) quelle che risultano in bande distribuite lungo tutta la lunghezza dell'intero cromosoma, come le bande -G, -Q, ed -R; e 2) quelle che colorano un ristretto numero di bande o strutture specifiche, come le bande -C (centromeriche) e le bande -T (telomeriche).

Le anomalie cromosomiche vengono descritte secondo lo "International System for Human Cytogenetic Nomenclature"<sup>3</sup>.

Cariotipo: assetto dei cromosomi secondo la loro grandezza, i più grandi per primi e i più piccoli per ultimi. Un cariotipo femminile normale è descritto come 46, XX, e uno maschile come 46, XY.

Bandeggio: rivelazione di bande e/o regioni intracromosomiche di varia intensità mediante l'uso di colorazioni differenziali; le metodiche più comunemente utilizzate identificano bande -Q, -G, -C, -R, e -T.

Traslocazione: una rottura in almeno due cromosomi, con scambio di materiale. In una traslocazione reciproca non c'è una evidente perdita di materiale cromosomico. Le alterazioni sono indicate dalla lettera t; i cromosomi coinvolti sono annotati nel primo set di parentesi (per convenzione il cromosoma con il numero più basso è indicato per primo). La traslocazione Ph<sup>1</sup> è descritta come t(9; 22)(q34; q11).

Delezione: perdita di un segmento di cromosoma come risultato di una singola rottura (delezione terminale), o di due rotture con perdita del frammento interposto (delezione interstiziale).

Inversione: rottura nello st

ne del segment  
Isocromosoma  
due copie di un  
centromero), co

Clone: in c  
presenza di aln  
cromosoma ac  
riarrangiato, o  
dita dello stess

Diploidia:  
mali dei crom

Aneuploidia  
mosomi, dov  
ploide) o a per  
mi.

Pseudodipl  
mosomi accor  
mosomiche str

Anormalità:  
numerica o st  
zienti affetti d  
gica. Queste a  
o diagnostiche  
mia o linfoma  
presentano mu  
involte nella p  
patologie, e m  
stico.

In sintesi,  
cellule con lo  
rale (trasloca  
quisizione de  
cellule ipodip  
cromosoma,  
presenza di ur

## TRASLOCA CROMOSOM

Queste di  
possono esser  
to per entram  
zionamento  
eventi, si può  
gene per una  
lule T (TCR)  
venga colloca  
che viene co  
vengano all'i

Inversione: è il risultato di una doppia rottura nello stesso cromosoma con rotazione del segmento interposto.

Isocromosoma: cromosoma formato da due copie di uno dei due bracci (separati dal centromero), con perdita dell'altro braccio.

Clone: in citogenetica è definito dalla presenza di almeno due cellule con lo stesso cromosoma addizionale o strutturalmente riarrangiato, o da almeno tre cellule con perdita dello stesso cromosoma.

Diploidia: numero e composizione normali dei cromosomi.

Aneuploidia: numero anormale di cromosomi, dovuto o ad acquisizione (iperdiploide) o a perdita (ipodiploide) di cromosomi.

Pseudodiploidia: numero diploide di cromosomi accompagnato da anomalie cromosomiche strutturali.

Anormalità ricorrente: una anomalia numerica o strutturale osservata in più pazienti affetti dalla stessa neoplasia ematologica. Queste anomalie sono caratteristiche o diagnostiche di distinti sottotipi di leucemia o linfoma. Le anomalie ricorrenti rappresentano mutazioni genetiche che sono coinvolte nella patogenesi delle corrispondenti patologie, e molte hanno significato prognostico.

In sintesi, l'osservazione di almeno due cellule con lo stesso riarrangiamento strutturale (traslocazioni o delezioni) o con l'acquisizione dello stesso cromosoma, o tre cellule ipodiploidi per la perdita dello stesso cromosoma, è considerata diagnostica di presenza di un clone anormale.

### TRASLOCAZIONI E INVERSIONI CROMOSOMICHE

Queste due alterazioni cromosomiche possono essere raggruppate insieme in quanto per entrambe si verifica rottura e riposizionamento di DNA. A seguito di questi eventi, si può per esempio verificare che il gene per una proteina del recettore delle cellule T (TCR) o delle immunoglobuline (Ig) venga collocato vicino a un protooncogene, che viene così attivato, o che le rotture avvengano all'interno di un gene in entrambi i

cromosomi coinvolti, creando così un gene di fusione che codifica una proteina chimerica (per una revisione vedi ref. 4).

L'attivazione di un protooncogene è, ad esempio, la conseguenza della traslocazione (di cui esistono tre varianti, vedi Tab. 2) che si verifica nel linfoma di Burkitt; in tutti tre gli eventi c'è l'attivazione dell'oncogene *c-myc* per giustapposizione di sequenze delle regioni costanti della catena pesante o della catena leggera delle immunoglobuline<sup>5,6</sup>. In particolare, nella traslocazione t(8;14) il gene *c-myc* trasloca dal cromosoma 8 al cromosoma 14 nel locus della catena pesante, mentre una porzione del locus dell'immunoglobulina (VH) è traslocata al cromosoma 8. Nelle varianti meno frequenti t(2;8) e t(8;22) l'oncogene *c-myc* rimane nel cromosoma 8, mentre i geni per le regioni costanti delle catene leggere delle immunoglobuline (C kappa e C lambda) vengono traslocate sul cromosoma 8 in una regione distale all'oncogene *c-myc*. Durante il processo di traslocazione cromosomica le regioni regolatorie del gene *c-myc* vengono danneggiate o addirittura delete, per cui la sua espressione diventa subordinata all'influenza delle sequenze regolatorie del gene delle immunoglobuline che ora giace adiacente ad esso sullo stesso cromosoma (in configurazione *cis*). Di conseguenza, poiché nelle cellule B i geni delle immunoglobuline sono costantemente espressi, anche *c-myc* è attivato; l'allele *c-myc* normale presente sul cromosoma 8 non traslocato è, per contro, solitamente silente<sup>7</sup>.

Molte altre traslocazioni e inversioni risultano in attivazione genica. Ad esempio, il linfoma follicolare è quasi invariabilmente associato alla traslocazione t(14;18) (q32;q21), la cui conseguenza è la giustapposizione della regione joining della catena pesante delle Ig (14q32) con il gene *bcl-2* (B-cell leukemia/lymphoma 2) (18q21), che risulta così attivato<sup>8</sup>. La proteina *bcl-2* è unica fra i protooncogeni in quanto è in grado di bloccare la morte cellulare programmata (apoptosi), che rappresenta un meccanismo cellulare autonomo di suicidio. Durante lo sviluppo embrionale, la perdita definitiva di specifiche cellule si verifica mediante questo processo ed è una tappa cruciale dell'or-

+8); se dopo il  
di materiale al

-7); se dopo il  
arte del braccio

dopo il ?.

iche vengono  
tional System  
nclature"<sup>3</sup>.

iosomi secon-  
di per primi e  
otipo femmi-  
46, XX, e uno

bande e/o re-  
varia intensità  
differenziali;  
nte utilizzate  
-R, e -T.

in almeno due  
materiale. In  
n c'è una evi-  
mosomico. Le  
lla lettera t; i  
notati nel pri-  
enzione il cro-  
sso è indicato  
Ph<sup>1</sup> è descritta

i segmento di  
li una singola  
o di due rottu-  
interposto (de-

Tabella 2 - Traslocazioni e inversioni più frequenti nei linfomi.

Fenotipo	Riarrangiamento	Geni coinvolti		Frequenza	Ref.
CML	t(9;22)(q34;q11)	<i>abl</i>	<i>bcr</i>	95%	1, 10
B-LNH	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11) t(14;18)(q32;q21) t(11;14)(q13;q32)	<i>myc</i> <i>IgK</i> <i>myc</i> <i>IgH</i> <i>bcl-1</i>	<i>IgH</i> <i>myc</i> <i>IgL</i> <i>bcl-2</i> <i>IgH</i>	75-85% BL 5% BL 15% BL 80% SCCL 30% MCL	2, 5, 11 6, 12 12 8, 13, 14 15, 16
T-LNH	t(10;14)(q24;q11) t(2;5)(p23;q35) t(8;14)(q24;q11)	<i>tcl-3</i> <i>alk</i> <i>myc</i>	TCR-D <i>npm</i> TCR-A	5-10% 40-50% ALCL	17, 18 19, 20 21
B-CLL	t(11;14)(q13;q32) t(14;19)(q32;q13) t(2;14)(p13;q32)	<i>bcl-1</i> <i>IgH</i>	<i>IgH</i> <i>bcl-3</i> <i>IgH</i>	10-15%	22, 16 23 22
T-CLL	t(8;14)(q24;q11) inv(14)(q11;q32)	<i>myc</i> TCR-A	TCR-A <i>IgH</i>		24 25
B-MM	t(11;14)(q13;q32)	<i>bcl-1</i>	<i>IgH</i>		26
ATL	t(14;14)(q11;q32) inv(14)(q11;q32)	TCR-D TCR-D	<i>tcl-1</i> <i>tcl-1</i>		27, 18 29, 30
HD	t(2;5)(p23;q35)	<i>alk</i>	<i>npm</i>	11/13 casi	31

CML: leucemia mieloide cronica; B-LNH, T-LNH: linfomi non Hodgkin (B e T cellulari); B-CLL, T-CLL: leucemia linfatica cronica (B e T cellulare); B-MM: mieloma multiplo B; ATL: leucemia a cellule T dell'adulto; HD: morbo di Hodgkin; BL: linfoma di Burkitt; SCCL: linfoma a piccole cellule non clivate; MCL: linfoma a cellule mantellari; ALCL: linfoma a grandi cellule anaplastiche.

*abl*: Abelson; *bcr*: breakpoint cluster region; *IgH*: catena pesante delle immunoglobuline; *IgK*: catena leggera K delle immunoglobuline; *IgL*: catena leggera lambda delle immunoglobuline; *bcl-1*, -2, -3: B cell leukemia/lymphoma -1, -2, -3; *tcl-1*, -3: T-cell leukemia/lymphoma -1, -3; *alk*: anaplastic lymphoma kinase; *npm*: nucleophosmin.

ganogenesi; nei tessuti maturi, questo meccanismo è deputato a regolare il numero delle cellule. I topi transgenici che iperesprimono *bcl-2* nella linea cellulare B mostrano una aumentata sopravvivenza cellulare e sviluppano linfomi B<sup>9</sup>. La proteina *bcl-2* apparentemente media un blocco dell'apoptosi regolando i circuiti antiossidanti e riducendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno<sup>8</sup>.

Il primo esempio documentato di sintesi di proteine chimeriche a seguito di traslocazione cromosomica è derivato dal clonaggio del punto di rottura del cromosoma Philadelphia. In questa traslocazione, l'omologo cellulare del gene trasformante Abelson, *c-abl* (9q34) viene traslocato al cromosoma 22, dove si fonde con il gene *bcr* (break-point cluster region) (22q11). La proteina chimerica p210 *bcr-abl* che viene così prodotta ha

## ASPETTI METOI

una elevata att  
probabilmente r  
tante nella patog

## ALTERAZION

Oltre alle tra  
(RCT), osservat  
cifici tipi di linf  
scritte altre abe  
Fra le alterazion  
la trisomia 12 sc  
10% dei linfomi  
che, analizzati c  
gola struttura (3  
prendente 278  
analizzati, il 3-  
tre alterazioni r  
trisomia 18, tris  
21, perdita del  
monosomia 17,  
varie aberrazion  
inoltre messo  
aberrazioni coi  
somia 7 è stata c  
dei campioni cc  
muni ricorrenti  
campioni senza  
la traslocazione  
più frequentem  
riguarda l'assoc  
pi istologici, p  
associazione de  
diffusi a grandi

ABERRAZIONI  
PROGRESSIV

Molti tumor  
ratteristiche pi  
mento più mali  
di progressione  
dalle metastasi.  
crescita e dall'  
macologica. Gi  
dicato che gli  
morale sono a  
sequenziale di  
togenetici<sup>33</sup>.

una elevata attività tirosin-chinasica, che probabilmente rappresenta un fattore importante nella patogenesi della CML.

#### ALTERAZIONI NUMERICHE

Oltre alle traslocazioni comuni ricorrenti (RCT), osservate in varia percentuale in specifici tipi di linfomi (Tab. 2), sono state descritte altre aberrazioni ricorrenti (ROA). Fra le alterazioni numeriche, la trisomia 7 e la trisomia 12 sono state osservate in più del 10% dei linfomi con alterazioni cromosomiche, analizzati consecutivamente in una singola struttura (32). Nello stesso studio, comprendente 278 casi con alterazioni su 434 analizzati, il 3-10% dei casi mostravano altre alterazioni numeriche, quali trisomia 3, trisomia 18, trisomia 5, trisomia 11, trisomia 21, perdita del cromosoma Y, trisomia 6, monosomia 17, trisomia 9. Una analisi delle varie aberrazioni citogenetiche osservate ha inoltre messo in evidenza la presenza di aberrazioni coincidenti. Ad esempio, la trisomia 7 è stata osservata nel 17.4% (23/132) dei campioni con una delle traslocazioni comuni ricorrenti e solo nel 7.5% (11/146) dei campioni senza traslocazioni; in particolare, la traslocazione a cui la trisomia 7 si associa più frequentemente è la t(14;18). Per quanto riguarda l'associazione con specifici sottotipi istologici, più autori hanno descritto la associazione della trisomia 12 con i linfomi diffusi a grandi cellule.

#### ABERRAZIONI CITOGENETICHE E PROGRESSIONE TUMORALE

Molti tumori acquisiscono nel tempo caratteristiche più aggressive e un comportamento più maligno. I fenomeni caratteristici di progressione tumorale sono rappresentati dalle metastasi, dalle variazioni del tasso di crescita e dall'acquisizione di resistenza farmacologica. Già Nowell nel 1976 aveva indicato che gli eventi della progressione tumorale sono accompagnati dalla comparsa sequenziale di specifici cambi genetici e citogenetici<sup>33</sup>.

Una prima conferma a queste indicazioni è poi venuta dagli studi citogenetici in corso di leucemia mieloide cronica. Come già discusso, le fasi precoce e cronica della CML sono caratterizzate da una popolazione mieloide portatrice di una singola alterazione cromosomica, la traslocazione t(9;22) che produce il cromosoma Philadelphia. Quando la CML progredisce nella fase blastica, si possono sviluppare alterazioni cariotipiche aggiuntive, quali un secondo cromosoma Philadelphia, una trisomia 8, o un isocromosoma per il braccio lungo del cromosoma 17<sup>34</sup>.

Anche nei linfomi B-cellulari la progressione clinica è associata a variazioni citogenetiche sequenziali. La traslocazione t(14;18) che coinvolge il gene *bcl-2* si verifica nella maggioranza dei linfomi follicolari a basso grado. La progressione ad uno stadio più aggressivo avviene generalmente ad opera di un subclone le cui cellule contengono anche la traslocazione t(8;14) o un cromosoma 17q+; in entrambi gli eventi c'è il coinvolgimento del gene *c-myc*<sup>35,36</sup>. Anche la trisomia 7 e una delezione del 6q sono state dimostrate accompagnare il 30-60% dei linfomi ad intermedio ed alto grado di malignità portatori di traslocazione t(14;18); la trisomia 7 è meno comune nei tumori a basso grado<sup>37</sup> ed è stata dimostrata, in un caso, associata alla trasformazione da basso ad alto grado<sup>38</sup>.

Nel complesso, questi dati indicano che queste ultime aberrazioni ricorrenti possono giocare un ruolo nella progressione dei tumori e, forse, nella genesi di un sottogruppo dei LNH. La caratterizzazione molecolare di queste aberrazioni potrebbe avere implicazioni anche per tumori solidi, in quanto anche in queste neoplasie alcune delle alterazioni citogenetiche descritte nei LNH sono associate alla progressione tumorale<sup>39,40</sup>.

#### ALTERAZIONI CITOGENETICHE E TERAPIA

L'utilizzo di farmaci potenzialmente genotossici può comportare di per sé delle alterazioni cromosomiche, ma pochi studi hanno cercato di affrontare questo aspetto.

; B-CLL, T-CLL:  
emia a cellule T  
lule non clivate;

line; IgK: catena  
-1, -2, -3: B cell  
lastic lymphoma

ntato di sintesi  
ito di trasloca-  
o dal clonaggio  
soma Philadel-  
l'omologo cel-  
Abelson, *c-abl*  
cromosoma 22,  
*cr* (break-point  
proteina chime-  
sosi prodotta ha

Una prima osservazione aveva indicato una diminuita incidenza di metafasi normali in 34 campioni di LNH analizzati dopo il trattamento<sup>41</sup>. Nello studio di Offit e collaboratori<sup>32</sup> su 278 casi con alterazioni, 91 erano di campioni analizzati dopo il trattamento; una analisi di confronto tra i casi analizzati prima del trattamento e quelli post-trattamento ha evidenziato differenze quantitative significative. Nei campioni post-trattamento è stata dimostrata una aumentata complessità cariotipica misurata come numero di "breakpoints" e/o cromosomi marker; da sottolineare che i tassi di incidenza delle traslocazioni specifiche e delle altre aberrazioni citogenetiche più frequenti risultavano similmente distribuite nei due gruppi. In contrasto, nei campioni post-trattamento era significativamente aumentato il numero delle rotture cromosomiche meno frequenti e non-ricorrenti; queste aberrazioni potrebbero rappresentare delle modificazioni correlate al trattamento o, come visto prima, essere associate con gli stadi tardivi di progressione tumorale. Tali aberrazioni citogenetiche clonali indotte sono state osservate in leucemie umane acute post-trattamento citotossico<sup>42</sup> e in leucemia mieloida cronica dopo il trapianto di midollo<sup>43</sup>.

In conclusione, quindi, le aberrazioni citogenetiche possono essere raggruppate in: 1) traslocazioni comuni ricorrenti; 2) altre aberrazioni ricorrenti, e 3) aberrazioni osservate con bassa incidenza, e associate con gli stadi tardivi di progressione tumorale, forse come risultato dell'effetto diretto o della pressione selettiva del trattamento citotossico.

#### NUOVI APPROCCI METODOLOGICI PER LO STUDIO DELLE ALTERAZIONI CROMOSOMICHE

Le analisi citogenetiche convenzionali talvolta non riescono a fornire una informazione completa sulle alterazioni cromosomiche, o perché il numero delle metafasi è insufficiente o perché la morfologia dei cromosomi è insoddisfacente. Inoltre, poiché le analisi citogenetiche sono effettuate solo su cellule in divisione, vengono automat-

icamente escluse dall'analisi le cellule che rimangono in interfase (es, cellule completamente differenziate o con un basso indice mitotico).

Recentemente sono state sviluppate nuove metodiche molecolari che permettono di superare in parte i limiti della citogenetica convenzionale. Una delle metodiche più promettenti è la ibridizzazione in situ a fluorescenza (FISH), che utilizza sonde DNA cromosoma-specifiche non-radioattive e permette l'analisi di cellule sia in interfase che in metafase<sup>44</sup>. Mediante la FISH è possibile analizzare rapidamente un elevato numero di cellule, e non è necessario effettuare la coltura in vitro. Le applicazioni cliniche possono essere raggruppate in cinque aree principali: 1) identificazione di cromosomi marker; 2) identificazione di trisomie; 3) valutazione del significato (clonalità o meno) di una trisomia osservata in una singola cellula con metodica convenzionale; 4) monitoraggio post-trapianto di midollo per valutare l'attecchimento delle cellule del donatore; 5) rivelazione di malattia residua dopo remissione clinica, nei casi per i quali è disponibile una analisi citogenetica iniziale che consente di usare delle sonde "personalizzate"<sup>45-47</sup>.

#### CONCLUSIONI: LIMITI E RUOLO DELLA CITOGENETICA

L'analisi cariotipica convenzionale può risultare tecnicamente inadeguata in una elevata proporzione dei casi; i parametri che maggiormente influenzano il tasso di insuccessi sono da un lato legati alle fasi di processazione (ad es., un ritardo nel trasporto del campione al laboratorio di citogenetica può elevare il tasso di insuccessi fino al 50%), e dall'altro all'indice mitotico dei campioni (ad es., il tasso è del 21.5% nei linfomi a basso grado di malignità, e del 13.2% in quelli ad alto grado di malignità, come descritto nella casistica di Offit). In realtà anche in centri con buona esperienza in queste metodiche, un cariotipo soddisfacente viene ottenuto approssimativamente nell'80% dei casi<sup>32</sup>. Di questi, circa il 20% mostra un cariotipo normale, e a tutt'oggi

non è chiaro se normali o tumori principali metafasi analizzato precedentemente analizzare un elemento in metafase che sce un quadro p sa tumorale. T anomalità cro studiate simulta la, la FISH deve rata una metodi sostitutiva alla cit

L'analisi cit portante strume sificazione dell riscontro di una quisita conferr escludendo la d e fornisce una g l'istituzione di Specifiche anor ficano specific scomparsa di u diagnosi è un j definizione di trattamento, me riabilmente indi

Il prossimo plicazione terap quisite con l'usi togenetiche e proteine di fusi zioni sono dei ci, e quindi dei pia. Sfortunatar te proteine nucl cellulari; è per delle molecole morale. Un pos genica sulla te esempio, la mit cellule resistant

#### Bibliografia

1. Nowell PC, Hi me in human Science 1960;
2. Manolov G, chromosome 1

le cellule che  
lule completa-  
1 basso indice

viluppate nuo-  
permettono di  
la citogenetica  
metodiche più  
e in situ a fluo-  
a sonde DNA  
-radioattive e  
sia in interfase  
a FISH è possi-  
un elevato nu-  
sario effettuare  
azioni cliniche  
in cinque aree  
di cromosomi  
trisomie; 3) va-  
nalità o meno)  
na singola cel-  
lulare; 4) monito-  
llo per valutare  
del donatore;  
sidua dopo re-  
i quali è dispo-  
ca iniziale che  
"personalizza-

non è chiaro se questo rappresenti linfociti normali o tumorali. Gli insuccessi sono dovuti principalmente al limitato numero di metafasi analizzabile in ogni caso. Come visto precedentemente, la FISH consente di analizzare un elevato numero di cellule, sia in metafase che in interfase, e questo fornisce un quadro più rappresentativo della massa tumorale. Tuttavia, poiché solo poche anomalie cromosomiche possono essere studiate simultaneamente nella stessa cellula, la FISH deve attualmente essere considerata una metodica complementare e non sostitutiva alla citogenetica convenzionale.

L'analisi citogenetica costituisce un importante strumento per la diagnosi e la classificazione delle neoplasie ematologiche. Il riscontro di una anomalia cromosomica acquisita conferma la diagnosi di neoplasia, escludendo la diagnosi di iperplasia reattiva, e fornisce una giustificazione sufficiente per l'istituzione di un trattamento citotossico. Specifiche anomalie cromosomiche identificano specifici sottogruppi di linfomi; la scomparsa di una alterazione presente alla diagnosi è un parametro importante per la definizione di remissione completa post-trattamento, mentre la sua ricomparsa invariabilmente indica ricaduta.

Il prossimo passo importante sarà l'applicazione terapeutica delle conoscenze acquisite con l'uso combinato di metodiche citogenetiche e molecolari. Ad esempio, le proteine di fusione generate dalle traslocazioni sono dei veri antigeni tumore-specifici, e quindi dei possibili bersagli per la terapia. Sfortunatamente, esse sono generalmente proteine nucleari, e invariabilmente intracellulari; è perciò necessaria l'introduzione delle molecole terapeutiche nella cellula tumorale. Un possibile vantaggio della terapia genica sulla terapia convenzionale è, ad esempio, la minor possibilità di selezionare cellule resistenti.

### 3 RUOLO

venzionale può  
guata in una ele-  
i parametri che  
l tasso di insuc-  
alle fasi di pro-  
lo nel trasporto  
di citogenetica  
uccessi fino al  
ce mitotico dei  
del 21.5% nei  
nalignità, e del  
do di malignità,  
ca di Offit). In  
uona esperienza  
otipo soddisfa-  
ssimativamente  
sti, circa il 20%  
e, e a tutt'oggi

### Bibliografia

1. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960; 132:1497.
2. Manolov G, Manolova Y. Marker band in one chromosome 14 from Burkitt's lymphomas. *Natu-*

re 1972; 237:33-34.

3. Harnden DG, Klinger HP (eds.). *ISCN (1985): an international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel: Karger, 1985.
4. Rabbits TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372:143-149.
5. Taub R, Kirsch I, Morton C et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:7837-7841.
6. Rappold GA, Hancock H, Cremer T et al. C-myc and immunoglobulin kappa light chain constant genes are on the 8q+ chromosome of three Burkitt lymphoma lines with t(2; 8) translocations. *EMBO J* 1984; 3:2951-2955.
7. Ar-Rushdi A, Nishikura K, Erikson J et al. Differential expression of the translocated and the untranslocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma. *Science* 1983; 222:390-393.
8. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ et al. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Sem Cancer Biol* 1993; 4:327-332.
9. Strasser A, Harris AW, Cory S. bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 1991; 67:889-899.
10. Rowley JD. Chromosome abnormalities in human leukemia. *Annu Rev Genet* 1980; 14:17-39.
11. Zech L, Haglund V, Nilsson K et al. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17:47-56.
12. Croce CM, Nowell PC. Molecular genetics of human B-cell neoplasia. *Adv Immunol* 1986; 38:245-274.
13. Rowley JD. Identification of the constant chromosomal regions involved in human hematologic malignant disease. *Science* 1982; 216:749-751.
14. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E et al. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228:1440-1443.
15. Raffeld M, Jaffe ES. bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood* 1991; 78:259-263.
16. Erikson J, Finan J, Tsujimoto Y et al. The chromosome 14 breakpoint in neoplastic B cells with the t(11;14) translocation involves the immunoglobulin heavy chain locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:4144-4147.
17. Kagan J, Finan J, Letofsky J et al.  $\alpha$ -chain locus of the T-cell antigen receptor is involved in the t(10;14) chromosome translocation of T-cell acute lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:4543-4546.
18. Zutter M, Hockett RD, Roberts CWM et al. The t(10;14)(q24;q11) of T-cell acute lymphoblastic leukemia juxtaposes the  $\delta$  T-cell receptor with tcl-3, a conserved and activated locus at 10q24. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:3161-3165.
19. Le Beau MM, Bitter MA, Larson RA et al. The t(2;5)(p23;q35): a recurring chromosomal abnormality in Ki-1 positive anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 1989; 3:866-870.



20. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263:1281-1284.
21. Mc Keithan T, Shima EA, Le Beau MM et al. Molecular cloning of the breakpoint junction of a human chromosomal 8;14 translocation involving the T-cell receptor  $\alpha$ -chain gene and sequences on the 3' side of *myc*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:6636-6640.
22. Julisson G, Gahrton G. Chromosomal aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: Pathogenetic and clinical implications. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 45:143-160.
23. McKeithan TW, Rowley JD, Shows TB et al. Cloning of the chromosome translocation breakpoint junction of the t(14;19) in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:9257-9260.
24. Erikson J, Finger L, Sun L et al. Deregulation of *c-myc* by translocation of the alpha-locus of the T-cell receptor in T-cell leukemias. *Science* 1986; 232:884-886.
25. Denny CT, Yoshikai Y, Mac TW et al. A chromosome 14 inversion in a T-cell lymphoma is caused by site specific recombination between immunoglobulin and T-cell receptor loci. *Nature* 1986; 320:549-551.
26. Van den Berghe H, Vermaelen K, Lanwagie A et al. High incidence of chromosome abnormalities in IgG3 myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 11:381-387.
27. Sadamori N, Kusano M, Nishino K et al. Abnormalities of chromosome 14 at band 14q11 in Japanese patients with adult T-cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 17:279-282.
28. Sadamori N, Nishino K, Kusano M et al. Significance of chromosome 14 anomaly at band 14q11 in Japanese patients with adult T-cell leukemia. *Cancer* 1986; 58:2244-2250.
29. Miyamoto K, Tomita N, Ishii A et al. Specific abnormalities of chromosome 14 in patients with acute type of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer* 1987; 40:461-468.
30. Sadamori N. Cytogenetic implication in adult T-cell leukemia. A hypothesis of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 51:131-136.
31. Orscheschet K, Merz H, Heil J et al. Large-cell anaplastic lymphoma-specific translocation (t[2;5](p23;q35)) in Hodgkin's disease: indication of a common pathogenesis? *Lancet* 1995; 345:87-90.
32. Offit K, Jhanwar SC, Ladanyi M et al. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: correlations between recurrent aberrations, histology, and exposure to cytotoxic treatment. *Genes Chromosom Cancer* 1991; 3:189-201.
33. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194:23.
34. Rowley JD. Ph-positive leukemia, including chronic myelogenous leukemia. *Clin Haematol* 1980; 9:85-86.
35. Gauwerky CE, Hoxie J, Nowell PC et al. Pre B-cell leukemia with a t(8;14) and a t(14;18) translocation is preceded by follicular lymphoma. *Oncogene* 1988; 2:431-435.
36. Gauwerky CE, Huebner K, Isobe M et al. Activation of *c-myc* in a masked t(8;17) translocation results in an aggressive B-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 85:8867-8871.
37. Armitage JO, Sanger WG, Weisenburger DD et al. Correlation of cytogenetic abnormalities with histologic appearance in non-Hodgkin's lymphomas bearing t(14;18)(q32;q21). *J Natl Cancer Inst* 1988; 80:576-580.
38. Levine EG, Juneja S, Arthur D et al. Sequential karyotypes in non-Hodgkin's lymphoma: their nature and significance. *Genes Chromosom Cancer* 1990; 1:270-280.
39. Wolman SR, Cannuto PM, Golimbe M et al. Cytogenetic, flow cytometric and ultrastructural studies of 29 nonfamilial renal cell carcinomas. *Cancer Res* 1988; 48:2890-2897.
40. Solomon E. Colorectal cancer genes. *Science* 1990; 342:412-414.
41. Bloomfield CD, Arthur DC, Frizzera G et al. Non-random chromosome abnormalities in lymphoma. *Cancer Res* 1983; 43:2975-2984.
42. Berger R, Corriat ML, Derre J et al. Cytogenetic studies on ANLL in relapse. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 34:11-19.
43. Offit K, Burns JP, Cunningham I et al. Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell depleted bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75:1346-1355.
44. Chen Z, Morgan Rodman, Berger CS et al. Application of Fluorescence In Situ Hybridization in hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 63:62-69.
45. Paddighe PJ, Moesker O, Smeets D et al. Interphase cytogenetics of hematological cancer: Comparison of classified karyotyping and in situ hybridization using a panel of eleven chromosome-specific DNA probes. *Cancer Res* 1991; 51:1959-1967.
46. Anastasi J, Thaugaveln M, Vardiman JW et al. Interphase cytogenetic analysis detects minimal residual disease in a case of acute lymphoblastic leukemia and resolves the question of origin of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1991; 77:1087-1091.
47. Sahlin P, Mark J, Stenman G. Detection of hidden structural rearrangements by FISH in pleomorphic adenomas. *Genes Chromosom Cancer* 1995; 12:81-86.

## 9 I linfomi

Claudio Dogliani

I linfomi es-  
il 40% dei linf-  
gior parte di es-  
intestinale ed i  
L'intestino, bel  
organo linfoide  
metà della popo-  
simo umano. Il  
testinale ha ca-  
funzionali pecu-  
osservano anch-  
suto linfatico  
questo tessuto  
minato Mucosa  
sue, da cui l'ac-  
ticolare struttu-  
processi neopla-  
propongono le  
e funzionali de-  
ratteristiche si-  
clinici peculiar-  
rentemente sin-  
primitivamente  
MALT vanno p-  
nosologiche a s-

### IL MALT: CA- MORFOLOGIA

L'organizza-  
mo esemplific-  
dell'intestino t-  
capsulate, cost-  
che da cellule

This finding underlines the close biological relation between these two diseases, which is also shown by morphology, and genotypic and immunophenotypic analysis.

The method described for detection of this chromosomal translocation will allow better differentiation between borderline cases, most of which are T-cell lymphomas (eg, angioimmunoblastic lymphadenopathy type, lymphoepithelioid lymphoma, and pleiomorphic T-cell lymphomas) and some B-cell lymphomas, such as rare cases of chronic lymphocytic leukaemia of B-cell type with a high content of Hodgkin and Sternberg-Reed cells. It will be of interest to study transitional cases developing from one entity to another, as the occurrence—or lack of—t(2;5) would allow us better to understand the biological relevance of this translocation.

It is almost impossible to detect rearrangements of the T-cell receptor or immunoglobulin genes in cases of Hodgkin's disease, because of the small number of tumour cells. The t(2;5) translocation may therefore be used as an indicator of clonality. It can also be used to monitor patients during disease-free intervals. The sensitivity demonstrated in this study allows the detection of one *npm/alk*-positive cell in 100 000 negative cells.

This work was supported by Deutsche Krebshilfe, W55/92/Fe3.

#### References

- Boehm T, Rabbitts TH. A chromosomal basis of lymphoid malignancy in man. *Eur J Biochem* 1989; 185: 1-17.
- McLaughlin J, Chianese E, Witte ON. Alternative forms of the BCR/ABL oncogene have quantitatively different potencies for stimulation of immature lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1866-74.
- Lennert K, Feller AC. *Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas* (2nd revised edition). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1992.
- Mason DY, Bastard C, Rimokh R, et al. CD30 positive large cell lymphomas (Ki1 lymphoma) are associated with a chromosomal translocation involving 5q35 (see comments). *Br J Haematol* 1990; 74: 161-68.
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non Hodgkin's lymphoma. *Science* 1994; 263: 1281-84.
- Pebusque MJ, Lafage Pochitaloff M, Galland F, et al. Localization of two tyrosine kinase receptor genes with respect to the 5q35 chromosomal breakpoint of Ki 1 lymphoma cell lines. *Genes Chromosom Cancer* 1993; 8: 119-26.
- Ulrich A, Schiessinger Y. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990; 61: 203-12.
- Kadin ME. Common activated helper-T-cell origin for lymphomatoid papulosis, mycosis fungoides, and some types of Hodgkin's disease. *Lancet* 1985; 123: 864-65.
- Agnarsson BA, Kadin ME. Ki-1 positive large cell lymphoma. A morphologic and immunologic study of 19 cases. *Am J Surg Pathol* 1988; 12: 264-74.
- Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G, Stein H. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's Disease and Ki-1-positive anaplastic large cell lymphoma by combined southern blot and in situ hybridization. *Blood* 1989; 74: 810-16.
- MacLennan KA, Bennett MH, Vaughan-Hudson B, Vaughan-Hudson G. Diagnosis and grading of nodular sclerosing Hodgkin's disease: a study of 2100 patients. *Int Rev Exp Pathol* 1992; 33: 27-51.
- Merz H, Houssiau FA, Orscheschek K, et al. Interleukin-9 expression in human malignant lymphomas: unique association with Hodgkin's disease and large cell anaplastic lymphoma. *Blood* 1991; 78: 1311-17.
- Jücker M, Abts H, Li W, et al. Expression of Interleukin 6 and Interleukin 6 Receptor in Hodgkin's disease. *Blood* 1991; 77: 2413-18.
- Fischer P, Nacheva E, Mason DY, et al. A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade Non Hodgkin's Lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor  $\beta$ -chain gene. *Blood* 1988; 72: 234-40.
- Orscheschek K, Merz H, Schlegelberger B, Feller AC. An immortalized cell line with features of human follicular dendritic cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2682-90.
- Fonatsch C, Diehl V, Schaadt M, Burcher H, Kirchner HH. Cytogenetic investigations in Hodgkin's disease: Involvement of specific chromosomes in marker formation. *Cancer Genes Cytogenet* 1986; 20: 39-52.
- Ladanyi M, Parsa NZ, Offit K, Wachtel MS, Filippa DA, Jhanwar SC. Clonal cytogenetic abnormalities in Hodgkin's disease. *Genes Chromosom Cancer* 1991; 3: 294-99.