

L'apprendimento di classificazioni e schemi può essere un esercizio utile a fortificare la memoria, ma, come tutte le classificazioni, non serve a fare una diagnosi. Le classificazioni sono infatti un prodotto derivato da diagnosi corrette, delle quali esse riproducono soltanto alcuni aspetti, e non sempre in modo adeguato. Tale problema non si pone soltanto in campo oncologico, ma, forse in modo più stridente, nel lupus e nelle più importanti malattie del glomerulo.

Il materiale inviato al patologo deve essere etichettato coi dati anagrafici del paziente. Non solo per possibili scambi, ma anche perché al patologo è molto utile conoscere il sesso e l'età del paziente, per inquadrare rapidamente molti tipi di patologia.

Il materiale inviato è accompagnato da un foglio, coi dati anagrafici e con tutte le notizie cliniche ritenute utili.

Può sembrare che chi guardi al microscopio non abbia bisogno di tante informazioni. Purtroppo, non è vero.

Tutte queste informazioni sono importanti, ma la questione critica per avere una buona diagnosi dall'anatomopatologo è la conservazione dei tessuti o delle cellule, una volta prelevati. Appena allontanati dal corpo, infatti, i tessuti muoiono, e vanno rapidamente incontro a fenomeni regressivi, come un cadavere, ed in tempi molto brevi le strutture cellulari possono essere irriconoscibili. Per non parlare delle grandi molecole, oggetto di sofisticati esami (patologia molecolare), spesso critici per predire il comportamento di alcune neoplasie maligne.

La fissazione del materiale prelevato è quindi il cardine nella processazione di tale materiale per avere una corretta diagnosi citologica od istologica. È bene concordare la procedura col laboratorio di anatomia patologica di cui ci si serve. Il fissativo più comunemente usato in istologia è la formalina 10% tamponata a pH 7,4. Può essere acquisita in tutte le farmacie. Usare contenitori grandi, tali che il rapporto fra campione e volume di formalina sia di almeno 1/10.

La citologia ha regole più variabili, ed è quindi opportuno seguire con molto scrupolo le prescrizioni date dal laboratorio cui ci si rivolge.

Tutte le fasi successive della processazione del materiale inviato sono sotto la responsabilità del laboratorio di anatomia patologica, e sono di minore interesse. La fissazione, invece è sotto la responsabilità di chi invia il prelievo, e, purtroppo, è l'unica fase di tutto il procedimento caratterizzata dall'impossibilità di correzioni: una volta che il materiale non sia stato fissato in modo adeguato, risulta inutile per la diagnosi. Poiché spesso è impossibile ripetere una biopsia adeguata, non è difficile immaginare il danno che ne deriva.

La diagnosi istopatologica è un documento complicato. Si tratta infatti d'una specie di relazione su di un esperimento scientifico. Uso questo termine non per retorica, ma perché, come un esperimento scientifico, la diagnosi deve essere riproducibile, nel senso che i preparati istopatologici (vetrini) ed il materiale prelevato incluso in paraffina, dovrebbero essere conservati per tempi indefiniti in appositi archivi, in modo tale da poter controllare a distanza di tempo la correttezza della diagnosi.

È noto infatti che un paziente affetto da neoplasia maligna è sottoposto periodicamente a visite di controllo (follow-up), anche in istituzioni diverse da quella in cui è stata posta la diagnosi istopatologica. In tali circostanze, specialmente se l'oncologo ed il patologo sono diversi da quelli che studiarono il caso originariamente, dovrebbero avere sempre a disposizione il materiale originario, oltre alla diagnosi scritta. Non si deve dimenticare che tale materiale è proprietà del paziente, mentre l'istituzione che l'ha archiviato ne è semplice custode, con precise responsabilità di diligenza nella conservazione. Pertanto, nessuno si può opporre al rilascio di tale documentazione, quando richiesta.

Tenendo presenti queste finalità, nella diagnosi deve essere ben chiara la descrizione del materiale ricevuto dal patologo, con precisi dettagli anatomici (misure comprese). In particolare, non debbono mancare le dimensioni della lesione neoplastica eventualmente riscontrata, dato in genere utile per la stadiazione della neoplasia e come informazione predittiva della sua successiva evoluzione.

Il chirurgo spesso necessita d'informazioni sulla radicalità dell'intervento: ciò può essere espresso dall'individuazione dei bordi di resezione chirurgica sul materiale inviato al patologo. Questi, una volta individuati, solitamente li contrassegna con inchiostro di china, per poterli identificare con precisione al microscopio, stabilendo con certezza l'eventuale presenza di neoplasia in tali sedi.

Alla descrizione del materiale inviato al patologo segue un elenco dei campioni prelevati, in genere contrassegnati con una lettera ed un numero. La stessa lettera contrassegnerà ciascun preparato istologico (vetrino) e ciascun incluso in paraffina corrispondente al preparato. Il numero indica invece il numero dei campioni prelevati dal materiale inviato al patologo, che dovranno quindi essere visibili sia nel vetrino che nell'incluso in paraffina. Ogni lettera con numero sarà accompagnata dalla descrizione del tipo di prelievo eseguito (sul tumore, sui tessuti apparentemente indenni, sui margini di resezione, su linfonodi, su strutture vasali). È bene ricordare che dev'essere sempre precisato il numero di linfonodi reperiti e prelevati, e che occorre indicare le dimensioni del linfonodo più grande, precisando se depositi metastatici siano riconoscibili macroscopicamente.

A questa accurata descrizione, segue la diagnosi, costituita dal nome della malattia individuata. Può infatti trattarsi anche di un processo non neoplastico. Qualora il quesito formulato al patologo sia stato "presenza o no di neoplasia", il patologo, oltre alla diagnosi specifica, dovrebbe sempre scrivere anche "non evidenza di neoplasia maligna" (la chiarezza nelle diagnosi è sempre fondamentale).

Se è presente una neoplasia maligna, bisogna denominarla correttamente sin dall'inizio, specificando in quanti dei campioni istologici esaminati essa sia presente e se si estenda o no sino ai margini. È poi di grande importanza verificare se la neoplasia infilti o no i vasi linfatici ed ematici, e, se siano presenti linfonodi, quanti di essi presentino depositi metastatici, e se i linfonodi siano sostituiti in parte o completamente dal tessuto neoplastico.

Occorre precisare che il nome delle neoplasie è oramai standardizzato, e riconducibile ad una nomenclatura originaria inglese, tradotta in tutte le lingue.

Poiché i nomi delle neoplasie cambiano, almeno in parte, nel tempo, è utile fare riferimento a siti internet attendibili, come quello dell'Istituto nazionale dei tumori di Milano, o quello americano del National Cancer Institute. Quest'ultimo è ottimamente aggiornato, ed ha versioni a vari livelli, per operatori sanitari ed anche per i pazienti.

La corretta definizione di una neoplasia prevede che ne sia stabilita la differenziazione (quanto, cioè, la neoplasia somigli ancora alla sua controparte tessutale normale), denominata grado (grading). La gradazione della neoplasia non è semplice, e soggetta ad una grossolana variabilità interpretativa. Essa richiede infatti l'interpretazione della grandezza delle cellule, della grandezza dei nuclei e dei nucleoli, dell'entità dell'attività mitotica e della presenza di mitosi anomale (tripolari, specialmente). Proprio questi particolari necessitano d'un'eccellente qualità del preparato. Per questa è fondamentale la qualità della fissazione. Attualmente, in istopatologia si è orientati a fornire dati il più possibile oggettivi e capaci di stabilire, più che una prognosi, legata alla differenziazione ed all'estensione nei tessuti di un determinato tipo di neoplasia, criteri predittivi circa la sua capacità di rispondere o no a certi tipi di terapia antineoplastica. Questo è il motivo per cui da circa un ventennio si è alla ricerca di marcatori genetici o molecolari delle cellule neoplastiche, per lo più correlati con la regolazione della moltiplicazione cellulare, capaci di fornire una precisa tipizzazione delle cellule neoplastiche. A questo proposito, molto nota è la ricerca di marcatori indicativi della presenza di recettori ormonali nelle neoplasie della mammella, della prostata, dell'endometrio e dell'ovaia.

Quando si attuino studi di patologia molecolare, il patologo deve sempre riportare con precisione la metodica utilizzata, precisando anche le industrie produttrici dei reagenti utilizzati. Ciò vale in particolare per i casi in cui si utilizzino anticorpi. A parte la colorazione routinaria all'ematosilina-eosina, nella diagnosi debbono essere riportate tutte le colorazioni utilizzate (anche, eventualmente, la microscopia elettronica), in modo tale che tutto il percorso diagnostico sia sempre tracciabile.

Occorre fare un'altra precisazione importante. Non è per niente semplice stabilire se le cellule neoplastiche si trovino veramente all'interno di strutture vasali, linfatiche o ematiche. Poiché la patologia molecolare è in grado di evidenziare un discreto numero di marcatori attendibili per differenziare le cellule endoteliali dei linfatici da quelle dei vasi ematici, ed anche altre strutture della parete di questi vasi, un patologo serio dovrebbe sempre servirsene. L'invasione dei vasi ematici cambia infatti drammaticamente le caratteristiche evolutive di una neoplasia maligna.

Lo sviluppo di farmaci antiblastici si è soprattutto concentrato sul carcinoma renale a cellule chiare, che comprende il 70-90% dei casi di carcinoma a cellule renali. Gli altri tipi, denominati globalmente 'a cellule non chiare', comprendono i tipi papillare, cromofobo e con traslocazione. Sono rari, e costituiscono un gruppo eterogeneo e poco studiato.

Richiederebbero maggiore attenzione.

Non esistono screenings per il cancro del rene utili a scoprire precocemente il tumore primario o le metastasi. Più spesso il cancro del rene è diagnosticato nel corso di un'ecografia effettuata per altri motivi. Quasi il 20% dei pazienti presenta metastasi all'atto della prima diagnosi, ed un ulteriore 20-30% sviluppa metastasi dopo il trattamento chirurgico. Questa carenza di uno screening precoce efficace ha come conseguenza un numero molto alto di pazienti che sviluppano metastasi, solitamente mortali.

Nella primavera del 1917, in *Nature reviews disease primers*, è stata pubblicata una revisione molto interessante del carcinoma renale, citata negli approfondimenti. Essa si caratterizza per un'interpretazione meno negativa delle possibilità di successo nel trattamento dei carcinomi renali. Essa propone anche una classificazione istopatologica più complessa rispetto a quella presentata da Motzer, con precise correlazioni tra morfologia e modificazioni dei geni implicati nell'evoluzione delle neoplasie.

Ho riportato alcuni stralci dell'articolo, oltre alle illustrazioni, di particolare interesse per capire lo stato attuale della terapia chirurgica ed oncologica.

Unibo non è abbonata a *Nature reviews disease primers*, tuttavia, da agosto l'articolo è stato reso disponibile gratuitamente on-line. Chi fosse interessato, farebbe bene ad affrettarsi, perché tali permessi sovente non sono permanenti. Di seguito riporto alcuni stralci.

**Sottotipi del carcinoma a cellule renali**

Il 75% dei carcinomi a cellule renali (RCC) è costituito da carcinomi a cellule chiare. I papillari costituiscono circa il 15% dei cancri del rene e sono divisi in due sottotipi: tipo 1 o basofilo e tipo 2 o eosinofilo. I cromofobi sono circa il 5%.

Altri sottotipi minori includono il carcinoma a cellule renali associato alla traslocazione familiare MiT e il carcinoma a cellule renali tipo dotti collettori.

Altri sottotipi minori sono il carcinoma a cellule renali midollare, il carcinoma a cellule renali papillare a cellule chiare, il carcinoma a cellule renali associato a malattia cistica acquisita, il carcinoma a cellule renali tubulocistico, il carcinoma a cellule renali tubulare mucinoso e a cellule fusate, il carcinoma a cellule renali deficiente in succinico-deidrogenasi, la leiomiomatosi ereditaria, il carcinoma a cellule renali associato all'oncocitoma, e l'oncocitoma.

I tumori che non rientrano in alcuna di queste categorie sono denominati carcinoma a cellule renali non classificato.

La perdita di VHL produce un abnorme accumulo di proteine HIF, benché la cellula non sia ipossica. Ne consegue un'abnorme attivazione di geni che regolano l'angiogenesi, la glicolisi e l'apoptosi. Questo spiega la ricchezza di lipidi e di glicogeno e la ricca vascolarizzazione nei carcinomi renali a cellule chiare, e l'efficacia degli inibitori di VEGF e del suo recettore nel trattamento delle metastasi di tali carcinomi. La sola perdita di VHL non è tuttavia sufficiente a indurre il carcinoma a cellule chiare. Ciò è evidenziato dalla lunga latenza a svilupparlo (oltre 30 anni) nei portatori di mutazioni VHL nella linea germinale, e dall'evidenza che la perdita di Vhl nei topi non induce il carcinoma a cellule chiare. Ciò fa ritenere che l'induzione richieda altri eventi genetici o epigenetici. La loro ricerca ha fatto scoprire molte nuove mutazioni presenti nel carcinoma a cellule chiare, come *PBRM1* (29–41% dei campioni tumorali studiati), *SETD2* (8–12%), *BAP1* (6–10%), *KDM5C* (4–7%) e *MTOR* (5–6%). È notevole che *PBRM1*, *SETD2* e *BAP1* codifichino proteine regolanti la cromatina e gli istoni, che siano localizzate in 3p21 ed agiscano come soppressori tumorali. Poiché VHL si trova in 3p25, una singola copy loss nel braccio corto del cromosoma 3 (3p) risulterebbe in un'aploinsufficienza di questi 4 geni oncosoppressori, avvalorando il fatto che la perdita di 3p (perdita di eterozigosi) è quasi universale nei carcinomi a cellule chiare e costituisce un evento genetico precoce.

Invece, le mutazioni *MTOR* sono in genere missense e dotate di azione attivante. Ciò spiega perché gli agenti che bloccano la via mTOR (everolimus, temsirolimus ed altri) siano efficaci nella terapia del carcinoma renale a cellule chiare.

Il meccanismo patogenetico e le interazioni reciproche di queste mutazioni, nonché il loro significato prognostico o predittivo non sono ancora noti. Sono state tuttavia notate alcune correlazioni cliniche degne di ulteriori studi.

Mentre l'inattivazione di VHL non ha effetti sul decorso clinico, *PBRM1*, *SETD2*, *BAP1* e *KDM5C* si associano ad un decorso clinico aggressivo. Così, piccole masse neoplastiche con *PBRM1* hanno caratteristiche da stadio III, *BAP1* si associa a grandi masse neoplastiche, grading di Fuhrman elevato, e ridotta sopravvivenza al cancro.

È poi di grande interesse che mutazioni in *BAP1*, *PBRM1* o *KDM5C* sembrino essere mutuamente escludenti. Se ciò si dimostrasse vero, sarebbe possibile una classificazione molecolare del carcinoma renale a cellule chiare. Poi, le mutazioni in *KDM5C*, posto in Xp11.22, si trovano per lo più negli uomini, e rispondono a lungo alla terapia con sunitinib; quelle invece in *SETD2* sembrano associarsi ad una riduzione dell'intervallo libero da recidive.

Già 40 anni fa si era sostenuto che la diversità genetica all'interno dei tumori sia il substrato su cui agisce la selezione naturale. In tal modo i tumori riescono ad adattarsi a nuove pressioni microambientali o necessità metaboliche durante la loro storia naturale. In alcuni casi con localizzazioni multiple e localizzazioni metastatiche del carcinoma renale a cellule chiare, si è visto che la mutazione di VHL e la perdita di eterozigosi di 3p sono presenti in tutte le sedi esaminate, mentre le mutazioni *SETD2*, *PBRM1*, *MTOR*, *PIK3CA*, *PTEN* e *KDM5C*, non avevano distribuzione omogenea, anche in una stessa sede.

Sulla base di questa distribuzione a nicchie delle mutazioni sono stati costruiti gli alberi evolutivi di queste neoplasie. Non meraviglia che l'evoluzione non sia soltanto ad albero, ma anche parallela. Le stesse mutazioni si verificano cioè in cellule neoplastiche in sedi diverse, in maniera in apparenza indipendente. Ciò dimostra la grande pressione svolta dall'ambiente sul verificarsi di ben precise mutazioni, perché di grande valore per il successo della cellula neoplastica.

Nel complesso, il carcinoma renale a cellule chiare sembra avere percorsi evolutivi fortemente condizionati, quindi, in un certo senso, prevedibili, e, quindi, aggredibili con la terapia.

Alcuni carcinomi renali pongono grossi problemi nella classificazione istologica, perché con caratteristiche proprie di diversi tipi istologici. Le cellule chiare sono presenti nelle forme papillari, nel cromofobo ed in quello con la traslocazione famigliare MiT. Anche le papille possono essere presenti in tumori diversi dal papillare. Nei casi più problematici, una paziente valutazione delle singole cellule, del tipo di accrescimento della neoplasia, l'immunofenotipo e le alterazioni genetiche possono consentire una diagnosi. Tuttavia, un 4% dei casi appartiene alla categoria dei carcinomi a cellule renali indeterminati.

Recentemente, tuttavia, una serie di questi indeterminati (62 casi) si è presentata con una serie di alterazioni relativamente comuni: perdita di NF2 (26%), attivazione della via del complesso mTOR 1 (mTORC1) (21%) e mutazioni nei regolatori della cromatina e del danneggiamento del DNA (21%).

Tutti i carcinomi a cellule renali possono contenere aree a grading elevato, costituite da cellule fusate (differenziazione sarcomatoide). Si pensa pertanto che non esista una variante sarcomatoide autonoma, ma che quest'aspetto costituisca un'evoluzione di tutti i carcinomi a cellule renali. Queste aree sono insolitamente ricche in mutazioni di TP53 e CDKN2A. Tali mutazioni sono forse la causa della differenziazione sarcomatoide.

Il tumore di Wilms (nefroblastoma) è di gran lunga il più comune cancro renale pediatrico, e costituisce il 6% delle diagnosi di cancro al di sotto dei 15 anni, con un'incidenza di 8 casi per milione. Sotto i 5 anni, il tumore di Wilms costituisce il 10% di tutti i cancri pediatrici, ed ha la più alta incidenza sotto i 2 anni.

Si stima che negli USA si abbiano 500 nuove diagnosi ogni anno. Nel 7% dei casi è bilaterale, ed in tal caso si manifesta più precocemente. Questa tendenza a manifestarsi più precocemente si osserva anche quando il tumore si presenta nell'ambito di anomalie congenite o di sindromi (WAGR, sindromi di Denys-Drash e di Beckwith-Wiedemann) È stata segnalata un'associazione fra tumore di Wilms e più di 50 condizioni cliniche e con varie anomalie cariotipiche. Tuttavia le prove d'un aumentato rischio per questa neoplasia esiste soltanto per una minoranza di queste. Esse includono le sindromi associate a WT1, il tumore di Wilms familiare, e certe condizioni d'ipertrofia locale come la sindrome di Beckwith-Wiedemann. In molte altre condizioni, probabilmente l'associazione è puramente casuale.

Beckwith & c. identificarono due distinte lesioni precorritrici del tumore di Wilms. I resti nefrogenici intralobari (ILNR), dentro il lobo renale, nel seno renale o nelle pareti dei calici, associati a WAGR alla sindrome di Denis-Drash e ad anomalie genitourinarie. I resti nefrogenici perilobari ((PLNR), posti alla periferia del lobo renale e spesso multipli, si associano alla sindrome di Beckwith-Wiedemann ed all'emiipertrofia. I tumori derivati da ILNR hanno spesso una componente stromale dominante, gli altri hanno invece una prevalenza blastematoso o a cellule epiteliali embrionarie.

Nature Genetics

published online 21 August 2017; doi:10.1038/ng.3940

Hanno eseguito un **genome-wide sequencing** in una serie di tumori di Wilms, identificando, oltre a quelli tradizionalmente implicati in questa neoplasia (**WT1, CTNNB1, AMER1, DROSHA, DGCR8, XPO5, DICER1, SIX1, SIX2, MLLT1, MYCN, and TP53**), mutazioni in geni considerati come non costantemente implicati in questa neoplasia, come **BCOR, BCORL1, NONO, MAX, COL6A3, ASXL1, MAP3K4 e ARID1A**.

**Ne sono emerse due classi di modificazioni genetiche in grado, rispettivamente, di conservare lo stato di progenitori delle cellule del blastema e/o di interrompere il normale sviluppo.**

**“Gain of LIN28B has been mechanistically tied to Wilms tumor development: overexpression of Lin28b within the preinduction metanephric mesenchyme of mice results in expansion of progenitor cells (due to sustained proliferation and delay of maturation), and formation of Wilms tumor, a process rescued by let-7 overexpression.”**

**“Therefore, Wnt-activating CTNNB1 mutations in Wilms tumors are likely to result in abnormal induction and/or continued progenitor proliferation.”**

**“Wilms tumors with exclusive epithelial histology are rare, usually low stage, and seldom relapse when completely resected. Such tumors are therefore not likely to be present in the TARGET discovery set.”**

TARGET denomina l'insieme di neoplasie esaminate nello studio.

“In conclusion, our comprehensive genomic analyses suggest that many different genetic changes converge on a limited number of developmental pathways resulting in oncogenesis. One such pathway is regulated by miRNA biogenesis (which promotes the progenitor state), and another is transcriptional elongation that prevents normal induction. Both rely on the epigenetic regulation of transcription during early renal development, which represents a fruitful area of future research. The large number of genes with driver mutations identified in Wilms tumor, combined with the relatively small number of gene expression patterns, suggests that future studies that attempt to target common processes or pathways may be more efficient than targeting individual gene mutations.”



Verbale diagnostico

### **Generalità del paziente e notizie cliniche**

**Descrizione** del materiale inviato, peso (rene o altri organi parenchimatosi), dimensioni della massa, specificazione della sua estensione alle strutture anatomiche riconoscibili (pelvi, vasi, linfonodi, capsula renale, surrene). Evidenziazione, quando possibile, dei bordi di resezione chirurgica con inchiostro di china.

**Elenco con lettere dell'alfabeto dei campioni prelevati per l'esame istologico.** Per ciascuno debbono essere specificati la sede del prelevamento ed il numero dei campioni, che dovranno apparire in ciascun preparato istologico. Il campionamento deve rispondere alle richieste del tnm e della stadiazione, ma può essere più abbondante, in funzione di quello che osserva il patologo all'esame macroscopico.

### **Diagnosi**

Essa comprende il nome della neoplasia, se c'è, il grado, e la sua estensione alle strutture prelevate, nonché la specificazione dell'eventuale raggiungimento del bordo di resezione chirurgica. Con le lettere alfabetiche usate, deve essere specificato punto per punto dove la neoplasia è presente. *Non è opportuno citare nella diagnosi il tnm, perché al patologo manca la possibilità di documentare metastasi a distanza. Inoltre, non sempre sono disponibili il linfonodi.* Vanno poi elencate tutte le colorazioni speciali utilizzate, e, soprattutto, gli antigeni rilevati con l'immunoistochimica e le tecniche di patologia molecolare utilizzate, specificando il produttore dei sieri o dei reagenti utilizzati. Queste procedure sono infatti un corollario della 'precision medicine', sono molto sofisticate, e suscettibili, in mani inesperte, di dare origine a grossolani errori interpretativi. Occorre quindi accertarsi che il laboratorio di anatomia patologica sia in grado di fornire le opportune garanzie di qualità, procedurale e diagnostica. Il materiale stesso deve essere conservato (verbale, inclusioni in paraffina e preparati istologici) in archivi sicuri (biobanche), dai quali possa essere agevolmente recuperato per il follow-up dei pazienti e per le revisioni diagnostiche.

La diagnosi anatomopatologica richiede quanto sopraesposto, in quanto necessita di essere sottoposta a periodiche revisioni sia da parte dell'istituzione in cui è stata elaborata, che da altre istituzioni, italiane o straniere, e l'iter percorso dall'autore della diagnosi deve essere riproducibile.