

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente Prof.ssa Milena Nasi
Vicepresidente Prof.ssa Paola Sena

TITOLO TESI DI LAUREA: VALUTAZIONE DI DOPPIA COLORAZIONE SU SINGOLA SEZIONE IN NEUROPATOLOGIA: COLORAZIONE IMUNOISTOCHIMICA CON EMA E Ki67 SU SEZIONI DI MENINGIOMA

NOME - COGNOME STUDENTE: Francesca Caiti

NOME - COGNOME RELATORE: Albino Eccher

NOME - COGNOME CORRELATORE (SE PRESENTE): Viscardo Paolo Fabbri

A.A: 2024-25

TESI SPERIMENTALE



COMPILATIVA



MESE ED ANNO DI LAUREA: 04/2025

RIASSUNTO O ABSTRACT (max 3000 caratteri):

La seguente tesi tratta la messa in campo di una moderna tecnica dell'immunoistochimica chiamata "Multiplex Immunohistochemistry".

L'immunoistochimica è una tecnica utilizzata per l'evidenziazione di Antigeni presenti su un tessuto grazie all'utilizzo di anticorpi marcati con enzimi e la successiva aggiunta di un substrato ed un cromogeno che, reagendo tra di loro, creano un precipitato colorato nel sito di legame tra Antigene e Anticorpo.

L'immunoistochimica multipla permette, tramite la stratificazione di più colorazioni con differenti cromogeni, di osservare due o più target all'interno di una stessa sezione di tessuto ed è stata studiata nell'ambito della neuropatologia valutando una doppia colorazione EMA e Ki-67 su sezioni di meningioma.

Il Meningioma origina dalle cellule meningoteliali ed è una delle neoplasie del Sistema Nervoso Centrale più diffuse, che si presenta generalmente tra la sesta e la settima decade di vita; la sua presenza è stata studiata in associazione con fattori di rischio biologici come la neurofibromatosi o ambientali come l'esposizione a radiazioni ionizzanti e la sua sintomatologia è spesso dovuta all'azione di compressione data dal Meningioma sul parenchima cerebrale.

Macroscopicamente il Meningioma si presenta come una massa bianco grigiastro adesa alle meningi ed istologicamente è caratterizzato da cellule fusate poligonali organizzate in fasci o vortici; dal punto di vista immunologico presenta positività all'Antigene EMA, utilizzato per la differenziazione del meningioma da altre neoplasie cerebrali.

Il Blue Book WHO del 2021 descrive il Meningioma su tre diversi gradi (grade 1, grade 2, grade 3), differenziandoli principalmente sulla base di criteri istologici come la velocità di crescita, il rischio di recidiva e l'invasività; tuttavia, non sempre le caratteristiche biologiche di un tumore correlano con il grado istologico assegnatogli, rendendo lo studio su nuovi marcatori che identifichino le neoplasie più aggressive un nuovo orizzonte per una gestione più accurata del paziente.

Il Ki-67 viene utilizzato in Istologia per definire l'indice proliferativo e il conseguente grado di aggressività della neoplasia, è un marcatore nucleare positivo in tutte le cellule che non si presentano in fase G0 ed è studiato per le possibili implicazioni diagnostiche, prognostiche e predittive del meningioma.



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico
e di Scienze Morfologiche con Interesse
Trapiantologico, Oncologico e di Medicina
Rigenerativa

www.chimomo.unimore.it

Lo studio del Ki-67, tuttavia, presenta alcuni limiti che ne mettono in dubbio il valore prognostico quali la mancanza di esecuzione della colorazione su ampie casistiche, l'estrema variabilità inter-osservatore e l'eventuale presenza nella sezione di tessuto di una porzione di infiltrato infiammatorio che porti ad una sovrastima dell'indice.

L'associazione del Ki-67 (nucleare) con EMA (di membrana) dovrebbe permettere una limitazione della sovrastima causata dalla presenza nell'ambiente peritumorale di cellule in fase proliferativa, potendo osservare l'ambiente tumorale evidenziato ed escludendo le cellule positive al di fuori della marcatura epiteliale.

La doppia colorazione è stata effettuata su 8 casi di Meningioma operati da gennaio a dicembre 2022, composti da 4 uomini e 4 donne con un'età media di 64 anni, prendendo in esame 5 meningiomi di grado 1, 2 meningiomi di grado 2 e un meningioma di grado 3.

La tecnica è stata effettuata dall'Immunocoloratore Ventana BenchMark ULTRA sviluppato da Roche Diagnostics, strumento completamente automatizzato che permette di effettuare tutti i passaggi della colorazione, dalla sparaffinatura alla reazione immunoistochimica in completa autonomia. Sono stati utilizzati il Kit D.A.B per la colorazione di EMA, risultante in un precipitato marrone dato dalla reazione del cromogeno D.A.B con la Perossidasi di Rafano e il perossido di idrogeno e il Kit Fast Red per la colorazione di Ki-67, consistente nella precipitazione di Fast Red di colore rosso data dall'interazione con Naftolo e Fosfatasi Alcalina.

Il protocollo utilizzato prevede 64 minuti di smascheramento antigenico, 24 minuti per la colorazione con il Kit Opti (D.A.B) e 28 minuti per il Kit Fast Red eseguendo infine una contro colorazione con ematossilina.

Il percorso che il campione esegue per arrivare alla colorazione immunoistochimica inizia dall'accettazione, dove viene registrato all'interno del sistema informatico per la tracciabilità; viene inserito all'interno di biocassette, processato disidratandolo con una scala ascendente di alcol e infine reso affine alla paraffina con lo xilolo. Viene quindi incluso in paraffina liquida per la creazione del blocchetto che verrà tagliato al microtomo per creare sezioni sottili, poi adagiate su vetrini porta oggetto.

Quando la sezione su vetrino è completamente asciutta e perfettamente adesa può essere preparata per la colorazione effettuando la sparaffinatura per permettere ai coloranti di penetrare al meglio. Questa è seguita dallo smascheramento antigenico, un passaggio fondamentale per liberare i siti antigenici che la formalina utilizzata per la fissazione del tessuto potrebbe aver mascherato; dopo di che si effettua l'incubazione dell'anticorpo primario specifico per il target, l'incubazione dell'anticorpo secondario marcato con enzima ed infine l'aggiunta del substrato e del cromogeno.

I risultati ottenuti dallo studio offrono una buona prospettiva per l'integrazione di questa doppia colorazione, semplificando la differenziazione tra elementi proliferativi peritumorali e cellule neoplastiche, anche se la valutazione anatomo patologica dei campioni analizzati non ha mostrato differenze significative.

A fronte delle numerose implicazioni vantaggiose precedentemente citate nell'utilizzo di questa tecnica, a cui vanno ad aggiungersi la riduzione del carico di lavoro dei tecnici e dello spazio di archiviazione necessario che questa comporta, si vuole raccomandare uno studio più ampio di comparazione tra Ki-67 su sigle slice e doppia colorazione per comprenderne i reali vantaggi, con la



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico
e di Scienze Morfologiche con Interesse
Trapiantologico, Oncologico e di Medicina
Rigenerativa

www.chimomo.unimore.it

prospettiva che l'evoluzione della digital pathology possa portare in futuro allo sviluppo di software per una stima oggettiva del target, limitando l'arbitrarietà dei cut-off odierni.

Luogo, data Modena 01/04/2023

Firma studente *Carla Pausacca*

Firma relatore *Alfio Echer*

Firma correlatore *Ulli*

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente Prof.ssa Milena Nasi

Vicepresidente Prof.ssa Paola Sena

TITOLO TESI DI LAUREA:**Trapianto di midollo ABO incompatibile: monitoraggio immunoematologico in automazione****NOME - COGNOME STUDENTE:** Flavia Digirolamo**NOME - COGNOME RELATORE:** Donatella Venturelli**NOME - COGNOME CORRELATORE (SE PRESENTE):** Lara Vecchi**A.A:** 2023-24**TESI SPERIMENTALE** ☒ **COMPILATIVA** ☐**MESE ED ANNO DI LAUREA:** Aprile 2025**RIASSUNTO O ABSTRACT (max 3000 caratteri):**

Il trapianto di midollo osseo è una terapia importante per diverse tipologie di patologie e permette di ricostituire un midollo non funzionante o patologico. La compatibilità del gruppo sanguigno tra donatore e ricevente non è un impedimento allo svolgimento di questa procedura, tuttavia può influenzarne l'attecchimento causando diversi quadri clinici, tra i più gravi abbiamo l'aplasia eritroide pura. Essenziale, invece, è la compatibilità del sistema HLA tra donatore e ricevente, che deve essere presente almeno parzialmente per poter eseguire un trapianto.

Prima del trapianto è necessario, però, effettuare il trattamento di condizionamento ed eventualmente uno o più plasma exchange per abbassare il titolo anticorpale e dopo il trapianto deve seguire un periodo di immunosoppressione per limitare eventuali fenomeni di rigetto.

Questa tesi si propone di analizzare tre pazienti seguiti presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Modena tra inizio ottobre 2022 e fine febbraio 2025. Questi hanno come particolarità il fatto che tutte le analisi, in particolare le titolazioni degli anticorpi, siano state eseguite in modo automatizzato. Inoltre, ai valori del titolo anticorpale nelle varie fasi del processo è stato associato il quadro clinico dei pazienti.

I tre pazienti analizzati sono stati sottoposti a trapianto.

I primi due pazienti, dopo il trapianto, hanno manifestato una diminuzione del titolo, e questo è stato confermato da un quadro clinico stabile e senza gravi complicazioni.

Il terzo paziente, invece, ha evidenziato una riduzione del titolo anticorpale dopo il trapianto dovuta alla presenza di aplasia eritroide pura, quindi il midollo non ha ripreso la sua funzione di produrre nuovi globuli rossi. Il monitoraggio anticorpale eseguito in automazione ha permesso di confermare questa condizione anche a livello laboratoristico.

Il monitoraggio in automazione ha permesso di standardizzare la procedura, ottimizzare i costi e la quantità di materiale utilizzato, non penalizzando i campioni di volume ridotto, di rendere più efficiente la tracciabilità dei risultati permettendo di avere a disposizione sempre un quadro completo della situazione. Tutto questo è stato applicato anche alla routine del laboratorio, infatti lo strumento riesce a svolgere molti campioni contemporaneamente, velocizzando i tempi di refertazione.



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico
e di Scienze Morfologiche con Interesse
Trapiantologico, Oncologico e di Medicina
Rigenerativa

www.chimomo.unimore.it

La titolazione in automazione è attualmente eseguita di routine ed è stata estesa ad altri ambiti immunoematologici. Inoltre, tale procedura è stata fondamentale nella valutazione positiva di accreditamento del Centro Trapianti di Midollo Osseo di Modena e validata JACIE (Joint Accreditation Committee of ISCT Europe and EBMT).

Luogo, data MODENA, 31/03/2025

Firma studente Digiacomo Flavia

Firma relatore Daniele Ullé

Firma correlatore Gentile



UNIMORE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento Chirurgico, Medico, Odontoiatrico
e di Scienze Morfologiche con Interesse
Trapiantologico, Oncologico e di Medicina
Rigenerativa

www.chimomo.unimore.it

Corso di Laurea in Tecnico di Laboratorio Biomedico

Presidente Prof.ssa Milena Nasi

Vicepresidente Prof.ssa Paola Sena

Titolo della Tesi di laurea:

**VALUTAZIONE MEDIANTE ANALISI PROTEOMICA DELL'EFFICACIA DELLA
TERAPIA CAUSALE (NON CHIRURGICA) NEL TRATTAMENTO DELLA
PARODONTITE**

Studente: Dario Saccone

Relatore: Dott.ssa Stefania Bergamini

Correlatore: Dott.ssa Elisa Bellei

Tesi SPERIMENTALE ☒

COMPILATIVA ☐

Mese e anno di Laurea: Aprile 2025

RIASSUNTO O ABSTRACT (max 3000 caratteri):

STATO DELL'ARTE

La parodontite (Pd) è un'inflammatione cronica dei tessuti di supporto dei denti dovuta a uno squilibrio del microbioma orale, che innesca una risposta immunitaria aberrante con distruzione progressiva del parodonto e possibile perdita dentale. La diagnosi si basa su valutazioni cliniche soggettive, supportate da esami radiologici. Il trattamento iniziale è la terapia causale non chirurgica (TCNC), mirata a rimuovere i fattori eziologici attraverso igiene orale, detartrasi e, se necessario, terapia antimicrobica.

OBIETTIVI

1. Analizzare il proteoma salivare di soggetti sani e pazienti con Pd mediante elettroforesi monidimensionale (1-DE) e spettrometria di massa (MS) per identificare potenziali biomarcatori salivari diagnostici e predittivi.
2. Valutare l'effetto della TCNC sul proteoma salivare dei pazienti con Pd.

DISEGNO SPERIMENTALE

Arruolamento: 16 soggetti sani (G1) e 10 con Pd (G2).

Raccolta della saliva: prima raccolta al tempo 0 (tutti i soggetti), seconda raccolta al tempo T1 (solo G2 dopo TCNC).

Analisi proteomica: estrazione e quantificazione proteine, pooling campioni, separazione con 1-DE, analisi MS delle bande differenzialmente espresse.

RISULTATI

Concentrazione proteica: più alta in G2 rispetto a G1 ($p=0,032$); ridotta dopo TCNC ($p=0,015$).

1-DE: 5 bande sovra-espresse in G2 rispetto a G1; riduzione dopo TCNC.

MS: 66 proteine sovra-espresse in Pd, coinvolte in infiammazione, stress ossidativo, degradazione tissutale e difesa antimicrobica.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

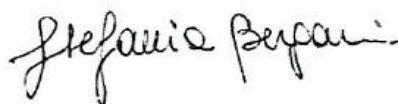
L'analisi proteomica ha identificato proteine sovra-espresse in Pd, alcune delle quali già associate alla patologia. Dopo TCNC, la loro espressione si è ridotta in concomitanza ai miglioramenti clinici, confermando l'efficacia della terapia. L'approccio proteomico salivare si propone come strumento diagnostico non invasivo per individuare biomarcatori, monitorare la progressione della Pd e personalizzare le terapie. Studi futuri su coorti più ampie saranno necessari per validare questi risultati.

Modena, 04.04.2025

Firma studente



Firma relatore Dott.ssa Stefania Bergamini



Firma correlatore Dott.ssa Elisa Bellei

