

Anno 5 - Numero 1 - 2018

# **Ematologia** **Oncologica**.it

## **Linfomi a grandi cellule**

Organo Ufficiale  
della **Fondazione Matarrelli** - Milano

*Con il supporto non condizionante di*



## Linfomi a grandi cellule

### **Definizione istologica**

*Marco Chilosi, Alberto Zamò*

**7**

### **Patogenesi**

*Marco Fangazio, Riccardo Dalla-Favera*

**17**

### **Quadro clinico**

*Roberta Sciarra, Luca Arcaini*

**27**

### **Standard terapeutici e nuove prospettive**

*Vittoria Tarantino, Stefano Luminari*

**35**

### **Clinica e terapia in età pediatrica**

*Marta Pillon, Davide Massano, Elisa Carraro*

**47**

## Ematologia Oncologica.it

Vol 5 - n.1 - 2018

### Direttore Responsabile

Giorgio Maggiani

### Direttore Scientifico

Giorgio Lambertenghi Deliliers

Fondazione Matarrelli, Milano

### Comitato Editoriale

Sergio Amadori

Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Mario Boccardo

Università degli Studi, Torino

Alberto Bosi

Università degli Studi, Firenze

Michele Cavo

Università degli Studi, Bologna

Antonio Cuneo

Università degli Studi, Ferrara

Marco Gobbi

Università degli Studi, Genova

Cristina Mecucci

Università degli Studi, Perugia

Fabrizio Pane

Università degli Studi, Napoli

Francesco Passamonti

Università degli Studi, Varese

Gianni Pizzolo

Università degli Studi, Verona

Giorgina Specchia

Università degli Studi, Bari

## Ematologia Oncologica.it

È una rivista quadrimestrale monotematica, di aggiornamento in lingua italiana, che ha essenzialmente lo scopo educativo di rendere disponibili le informazioni più aggiornate su argomenti pertinenti le malattie del sangue, in particolare quelle neoplastiche. Per raggiungere questo obiettivo la rivista desidera coinvolgere gli specialisti italiani più qualificati e informare il lettore sui più recenti progressi nel campo della ricerca di base, della clinica e della terapia.

La rivista si attiene alle raccomandazioni indicate dal World Association of Medical Editors (WAME) riguardante l'etica delle pubblicazioni in ambito sanitario.

### Registrazione Tribunale di Milano

n. 348 del 19/11/2013

### Progetto grafico

Dynamicom srl

### Sito Internet

www.ematologiaoncologica.it

### Coordinamento editoriale

Dynamicom - Milano

Tel. (+39)0289693750 - Fax (+39)02201176

### Editore

Fondazione Matarrelli

### Periodicità

Quadrimestrale

### Avvertenze ai lettori

L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni eventualmente citati negli articoli, ed invita il lettore a controllare personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

### Norme per gli Autori

- L'accettazione dei testi inviati è comunque subordinata al parere del Comitato Editoriale che deve verificare la loro compatibilità con le norme redazionali.

- Gli Autori dei testi sono gli unici responsabili del loro contenuto, e della riproduzione delle immagini allegate.

- Il primo Autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora utilizzi figure e/o tabelle già pubblicate altrove.

- La proprietà dell'articolo, una volta pubblicato, appartiene alla Fondazione Matarrelli, (Largo Crocetta, 2 - 20122 MI) che ha depositato il nome della rivista presso il Tribunale di Milano in data 19/11/2013

- Il manoscritto deve essere inviato a Dynamicom Edizioni (segreteria@ematologiaoncologica.it) che, dopo averlo controllato ed impaginato, lo invierà al Direttore Scientifico (giorgio.lambertenghi@unimi.it) per la revisione e il controllo della stesura secondo le norme redazionali. Le bozze di stampa verranno quindi rinviate all'Autore per le opportune correzioni, che dovrà provvedere entro cinque giorni lavorativi a rinviarle a: segreteria@ematologiaoncologica.it

### Norme redazionali

Il contenuto dell'articolo, redatto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh, non deve superare le 30-35 cartelle dattiloscritte (2000 battute cad.) compresa la bibliografia, e corredato delle illustrazioni (tabelle, grafici, figure) nel numero che l'Autore ritiene necessario, in file ad alta risoluzione (salvate in formato pdf, jpg o eps).

Lo stile del manoscritto, le citazioni bibliografiche e il loro riferimento nel testo del manoscritto devono seguire le raccomandazioni dell'International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Per le relative informazioni, gli Autori sono pregati di consultare il sito <http://www.icmje.org>.

### L'articolo deve essere così strutturato:

- **Titolo conciso** e pertinente con il tema della rivista;
- **Prima pagina** con nome e cognome degli Autori, istituzione di appartenenza, foto tessera a colori del primo Autore;
- **Introduzione iniziale** che esponga in maniera chiara lo scopo dell'articolo;
- **Corpo del testo** suddiviso in sottocapitoli a contenuto omogeneo;

### Pagina finale:

- 1) nome e cognome del primo autore, con telefono, fax, e-mail al quale andrà indirizzata la corrispondenza;
- 2) eventuali **ringraziamenti** a persone e/o associazioni;
- 3) 3-5 parole chiave.

### Bibliografia

Per lo stile nella stesura seguire le seguenti indicazioni o consultare il sito "International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals Sample References". Le **voci bibliografiche** non devono superare il numero massimo di 150, numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo, citate tra parentesi con il testo in apice e con i numeri arabi, tenendo presente gli esempi sottostanti.

### Articoli con 1-6 autori

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2000;30(1):100-1.

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2000;30(1):100-1.

### Articoli con più di 6 autori

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E, De Giglio I, Baldoni A, et al. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2000;30(1):100-1.

### Abstract e Congressi

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2000;100(10):1000.

### Capitoli di libri

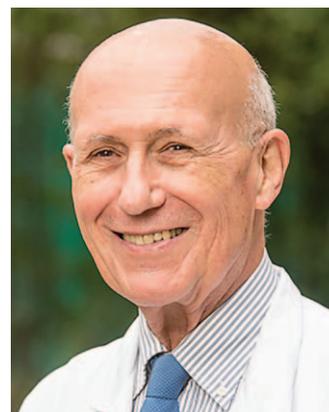
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. In: Spagnoletti M. ed. *The Hemoglobin*, Vol 10. London: Raven Livingstone. 1980:10-15.

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 1980:10-15.

# Editoriale

**Giorgio Lambertenghi Delilieri**

Fondazione Matarrelli - Milano



*Ematologia Oncologica.it* inaugura l'annata 2018 con un numero dedicato al linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) che secondo le ultime acquisizioni di ordine morfologico, immunofenotipico e molecolare, è suddivisibile in numerose, distinte sottoentità la cui definizione non è sempre facile e a volte di dubbia utilità nella pratica clinica. La diagnostica istopatologica è successiva alla valutazione clinica e basata sul prelievo biotipico programmato in accordo con l'anatomopatologo. Le cellule neoplastiche sono di taglia media o grande, confluenti in un pattern diffuso, appartenenti alla linea linfoide B CD20 positive, marcatore predittivo per la terapia con farmaci mirati. Le recenti linee guida indicano l'opportunità di individuare due categorie biologiche, classificate secondo la cellula d'origine come GCB e ABC. Una suddivisione che ha importanti corrispondenze cliniche, soprattutto di ordine prognostico. L'eterogeneità molecolare di questo tipo di linfoma deriva dal diverso arresto maturativo del linfocita B normale nel centro germinativo, secondario a delezioni, amplificazioni e mutazioni puntiformi del genoma, che causano l'attivazione di oncogeni e/o l'inattivazione di geni oncosoppressori. Alcune lesioni genetiche sono comuni ai sottotipi, altre sono specifiche dei GCB, come le traslocazioni cromosomiche di *BCL2* e di *MYC* o degli ABC che invece presentano attivazione cronica della via di segnalazione del *BCR* e di *NF-κB*. Queste segnalazioni utili alla comprensione della patogenesi del DLBCL hanno anche importanti implicazioni per lo sviluppo di nuovi farmaci più efficaci e meno tossici, come gli inibitori di *BCL2* o di *NF-κB*, attualmente in via di sperimentazione.

La presentazione clinica è caratterizzata da un rapido accrescimento dei tessuti nodali o extranodali, da sintomi sistemici e da quelli legati alla compressione e all'infiltrazione delle strutture adiacenti le sedi linfatiche. La valutazione iniziale prevede un'accurata anamnesi, gli esami di laboratorio, la definizione del *performance status* e la stadiazione strumentale con la RMN e l'esame PET/TAC. L'obiettivo è la stratifica-

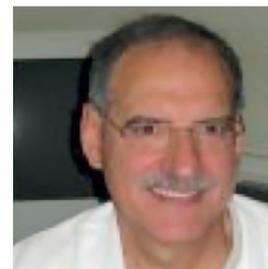
zione prognostica secondo sistemi ormai collaudati da una lunga pratica clinica. Alcuni sottotipi di DLBCL costituiscono però entità autonome, caratterizzate da una presentazione predominante extranodale che richiede uno specifico approccio terapeutico. Tra queste i linfomi primitivi dell'encefalo che si manifestano con disturbi cognitivi e motori, quelli a localizzazione mediastinica con i relativi sintomi da compressione, a sede cutanea con lesioni nodulari a rapida progressione o testicolare tendenti alla rapida diffusione in altre sedi.

Nonostante la sua aggressività clinica il DLBCL è attualmente considerato una malattia trattabile e guaribile nei due terzi circa dei casi. Tutto però dipende dalla valutazione iniziale del rischio e dall'età dei pazienti. Nei giovani in stadio localizzato i principali temi di discussione riguardano il numero di cicli di immuno-chemioterapia e l'indicazione al consolidamento con radioterapia in caso di residuo PET positivo. Negli stadi avanzati diversi protocolli, tuttora in corso, sono stati progettati con l'obiettivo di aumentare l'efficacia dello schema R-CHOP con trattamenti *dose-dense* o infusionali *dose-adjusted* o con l'introduzione di nuovi farmaci monoclonali o diretti verso i marcatori molecolari dei due principali sottogruppi identificabili con l'analisi di gene *expression profiling*.

Il DLBCL in età pediatrica ha una bassa incidenza (10-20% dei linfomi non-Hodgkin); le caratteristiche morfologiche sono sovrapponibili a quelle delle forme dell'adulto, ma sotto il profilo fenotipico hanno un indice proliferativo più elevato e risultano più frequentemente positive per *MYC*, *CD10* e *BCL6*. La malattia all'esordio si presenta più frequentemente nelle sedi extranodali, in particolare all'addome, con rarissima diffusione al midollo osseo e al sistema nervoso centrale. I regimi terapeutici, analoghi a quelli utilizzati per altri tipi di linfomi pediatrici, hanno permesso di ottenere un'eccellente sopravvivenza. La direttiva attuale è quella di finalizzare la terapia considerando il DLBCL un'entità separata sulla base dei recenti studi di biologia molecolare e di espressione genica.



# Definizione istologica



Marco Chilosi<sup>1</sup>, Alberto Zamò<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Anatomia Patologica, Ospedale P. Pederzoli, Peschiera del Garda, Verona

<sup>2</sup> Dipartimento di Oncologia, Anatomia Patologica 1U, Università di Torino

## Introduzione

Il linfoma B diffuso a grandi cellule (DLBCL), che costituiva una singola entità nosografica nelle prime classificazioni, è attualmente suddivisibile in numerose entità distinte sul piano clinico, morfologico e molecolare (Tabella 1)<sup>(1)</sup>. Questa dettagliata suddivisione rende possibile una caratterizzazione prognostica di innegabile utilità per l'ematologo, ma può presentare difficoltà per il patologo che voglia porre la diagnosi seguendone i criteri, specialmente se non dispone nel proprio laboratorio di metodologie ed attrezzature idonee. È peraltro ancora da definire quanto la suddivisione prospettata nelle più recenti classificazioni sia realmente necessaria/utile nella pratica clinica <sup>(2)</sup>. In quest'ottica è attualmente ancora sufficiente un approccio alla diagnosi differenziale dei linfomi B a grandi cellule basato sull'integrazione di morfologia, profilo immunofenotipico, e citogenetica (FISH). È peraltro da sottolineare che l'introduzione progressiva di test molecolari correlati alla patogenesi delle singole entità sarà l'evoluzione indispensabile della diagnostica dei linfomi, nell'ambito della medicina di precisione.

## Diagnostica istopatologica

La diagnostica dei DLBCL si basa su un algoritmo metodologico che prevede un'accurata valutazione anamnestica, laboratoristica e di *imaging* seguita, necessariamente, dalla precisa definizione istopatologica. In tutti i casi è necessario un approccio invasivo per ottenere idonei campioni di tessuto su cui effettuare le analisi morfologiche, immunofenotipiche e molecolari. Alla diagnosi segue la valutazione stadiativa dell'estensione della malattia, in cui l'esame istologico è importante, anche se non sempre necessario.

Linfomi diffusi a grandi cellule B NAS (DLBCL, NAS*) <ul style="list-style-type: none"><li>• Tipo a cellule B del Centro Germinativo</li><li>• Tipo a cellule B Attivate</li></ul>
Linfoma a cellule B ricco in linfociti T e macrofagi
DLBCL primitivo del sistema nervoso centrale (SNC)
DLBCL primitivo della cute, tipo "gamba"
DLBCL EBV1-positivo, NAS
Ulcera mucocutanea EBV1+
DLBCL associato a infiammazione cronica
Granulomatosi Linfomatoide
Linfoma B a grandi cellule primitive del mediastino (timico)
Linfoma B a grandi cellule intravascolare
Linfoma B a grandi cellule, ALK1+
Linfoma Plasmablastico
Linfoma primitivo Effusivo (PEL)
DLBCL HHV8-positivo, NAS
Linfoma B di alto grado con riarrangiamento di MYC, BCL2 e/o BCL6
Linfoma B di alto grado, NAS
Linfoma a cellule B, inclassificabile, con aspetti intermedi tra DLBCL e linfoma di Hodgkin classico
Linfoma di Burkitt
Linfoma simil-Burkitt con anomalia 11q
* NAS = non altrimenti specificato

Tabella 1 - DLBCL - Classificazione WHO 2016

La scelta della sede anatomica e delle modalità del prelievo è, nella pratica, demandata all'ematologo e/o al chirurgo, ma la complessità del processo diagnostico rende auspicabile un approccio multidisciplinare, in cui il patologo venga coinvolto per analizzare a priori la tipologia del prelievo, le modalità di manipolazione (tempistica e tipo di fissazione, quantità di materiale necessario, sede del prelievo, etc.), non solo nel singolo caso, ma anche nella costruzione di un percorso in cui vengono dettagliatamente condivisi criteri e metodologie, finalizzati all'acquisizione di tutti i dati necessari, minimizzando i disagi ed i rischi per il paziente.

La biopsia linfonodale è di solito di tipo escissionale, ma per linfonodi voluminosi o profondi può essere più indicata una biopsia incisionale o con *tru-cut* (ago grosso con guida eco/TAC) <sup>(3)</sup>. Per la diagnostica dei DLBCL l'esame citologico non è raccomandato, anche se in alcuni casi può rappresentare il solo materiale disponibile per l'analisi morfologica ed immunohistochimica <sup>(4, 5)</sup>. Si raccomanda che il tessuto non sia frammentato o schiacciato per evitare artefatti e scarsa rappresentatività del campione.

A tale scopo la biopsia, appena effettuato il prelievo, deve essere tempestivamente inviata al laboratorio di anatomia patologica, in garza umida, dove il personale procederà all'eventuale riduzione del campione, allestendo (se previsto dal protocollo) prelievi per criopreservazione e/o campioni a fresco per esami molecolari (si fa pre-

sente peraltro che numerosi test molecolari possono attualmente essere effettuati su acidi nucleici estratti dal campione fissato). È buona norma effettuare fotografie del campione per il riconoscimento e la valutazione macroscopica.

## Morfologia

La definizione morfologica del DLBCL è quella di una neoplasia che diffusamente infiltra il tessuto linfonodale, in cui non è più riconoscibile la struttura (*pattern* diffuso). La sostituzione può essere totale o parziale. La localizzazione parziale può assumere aspetto interfollicolare, risparmiando i follicoli reattivi, o di tipo sinusoidale, o meno frequentemente con netta distinzione tra aree coinvolte ed aree a struttura conservata (Figura 1).

Le cellule neoplastiche sono per definizione di taglia media o grande, circa maggiore di due volte la taglia di un linfocita normale (15-30 micron). Le cellule neoplastiche sono in ogni caso commiste a linfociti di piccola taglia e fenotipo T e macrofagi in numero molto variabile, da scarsissimi a prevalenti, rendendo talora il riconoscimento delle cellule neoplastiche problematico. La sola morfologia può essere fortemente suggestiva, ma la diagnosi di linfoma B necessita in ogni caso di conferma immunohistochimica. La morfologia delle cellule neoplastiche è eterogenea con prevalenza di casi a citologia centroblastica (circa 80% dei casi), cui segue quella im-

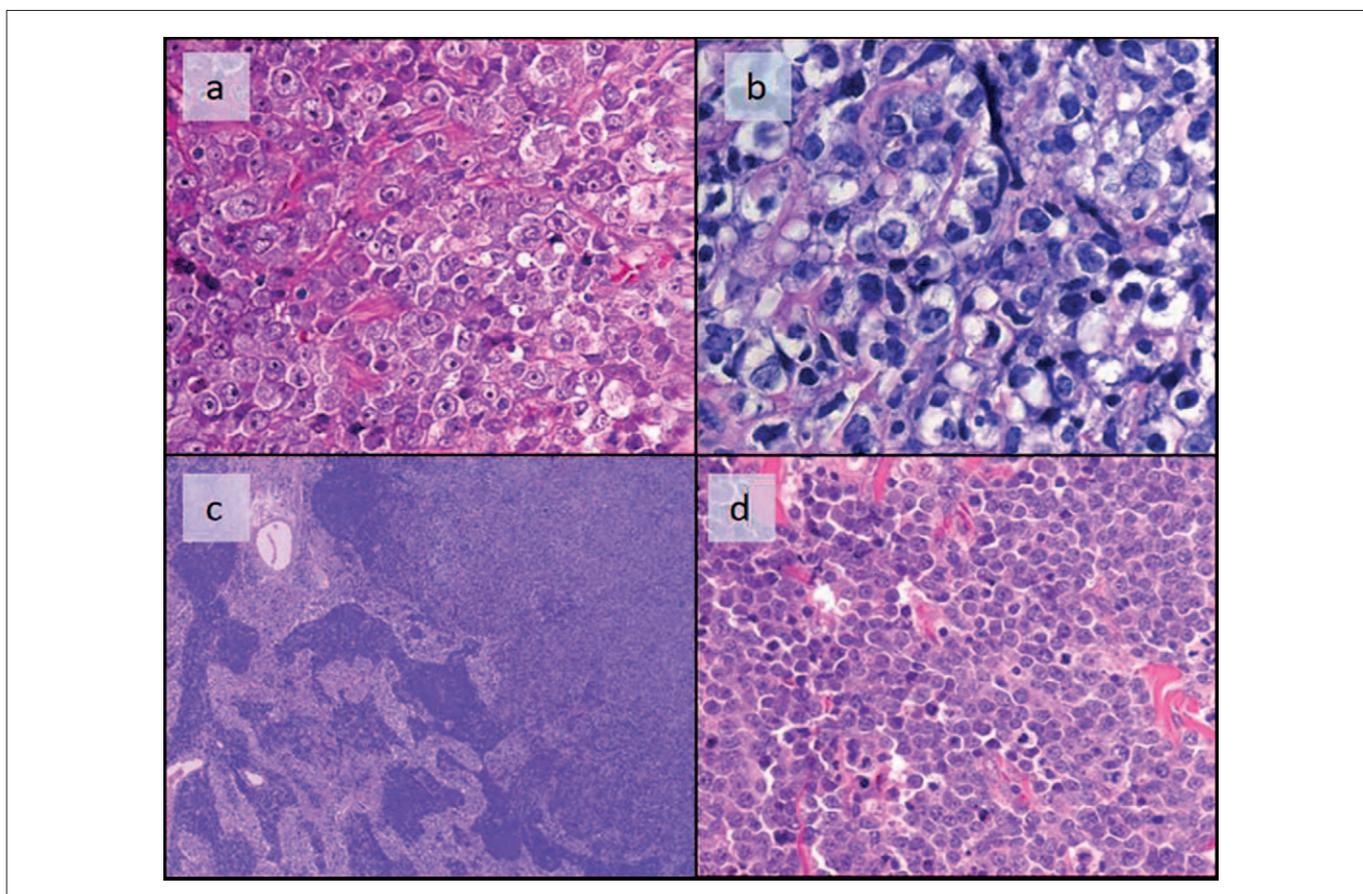


Figura 1 - Aspetti morfologici dei DLBCL (E&E): a) immunoblastico; b) a cellule chiare (mediastinico); c) localizzazione linfonodale parziale, d) DLBCL di alto grado, NAS.

munoblastica (8-10%), e più raramente anaplastica. I centroblasti sono caratterizzati da scarso citoplasma, nuclei vescicolosi rotondi od ovali e nucleoli disposti perifericamente sulla membrana nucleare. Gli immunoblasti hanno un nucleo fornito di grosso nucleolo centrale e ampio citoplasma basofilo (Figura 1). Nei rari casi a morfologia anaplastica le cellule neoplastiche sono molto grandi e presentano nuclei di forma bizzarra e pleomorfa, talvolta simili a cellule di Reed-Sternberg.

La definizione cito-morfologica è importante per inquadrare la diagnosi differenziale, in parte correlata con i sottotipi GCB/ABC (vedi dopo), ma non è affidabile come indicatore prognostico, anche per la frequente commistione dei due cito-tipi. Nelle forme extra-nodali possono presentarsi altri rari tipi di morfologia, presumibilmente determinate da peculiari condizioni micro ambientali o artefattuali, con forme a cellule fuse a livello cutaneo<sup>(6,7)</sup>, forme a cellule chiare, talvolta simil-seminomatose nel DLBCL del mediastino<sup>(8,9)</sup> (Figura 1).

## Immunofenotipo

La caratterizzazione immunofenotipica è attualmente indispensabile per la definizione diagnostica e prognostica dei linfomi, come fortemente raccomandato dalle linee guida nazionali ed internazionali<sup>(1,3)</sup>. Le analisi immunocitochimiche sono attualmente effettuabili su tessuto fissato ed incluso con metodi di routine, utilizzando strumenti automatici e reagenti standardizzati e di elevata sensibilità.

La disponibilità di anticorpi sonda (anticorpi primari, prevalentemente monoclonali) è molto ampia e consente la possibilità di effettuare caratterizzazioni immunofenotipiche complete in ogni laboratorio.

## Diagnosi differenziale ed algoritmo diagnostico

L'analisi morfologica del tessuto (linfonodo o tessuto extra-linfonodale) è il primo indispensabile passo del processo diagnostico. L'esame istologico inizia con l'osservazione delle caratteristiche morfologiche a piccolo ingrandimento su preparati colorati con ematossilina ed eosina (E&E). Il pattern diffuso è caratterizzato dalla confluenza degli elementi atipici, ed è di per sé diagnostico di processo neoplastico, anche se non ne è definita la natura. Si procede quindi con una valutazione citologica (a più forte ingrandimento), verificando la grandezza delle cellule atipiche in percentuale (grandi, piccole o intermedie), la loro eterogeneità, il rapporto nucleo/citoplasma, la presenza e tipologia dei nucleoli, la presenza di cellule accessorie (ad es. macrofagi che danno un quadro *starry-sky*, a cielo stellato), la presenza di mitosi (da valutare quantitativamente su più campi microscopici), di corpi apoptotici, di necrosi.

Sulla base dell'insieme di tutti questi elementi si formula una diagnosi differenziale che può comprendere diverse opzioni clinica-

mente rilevanti, risolvibile nella maggior parte dei casi con una idonea caratterizzazione immunocitochimica. La correttezza della programmazione dei marcatori da effettuare è fondamentale per raggiungere l'obiettivo diagnostico nel modo più efficace, rapido ed economico, evitando esagerazioni, scelta di marcatori non coerenti con la diagnosi differenziale (costi ingiustificati), eccessivi frazionamenti e dilatazione dei tempi d'attesa, o omissioni che possano portare ad errori, imprecisione o incompletezza nella diagnosi (concetto variabile nel tempo a causa dell'evoluzione delle conoscenze, dei protocolli e quindi delle esigenze cliniche). È quindi fondamentale che il patologo segua l'evoluzione delle linee guida aggiornando il repertorio di reagenti ed il significato del loro impiego, in stretto rapporto con l'ematologo con cui attivare attività di aggiornamento multidisciplinare.

Un primo punto fondamentale è quello della conferma o esclusione della natura linfoide B delle cellule neoplastiche con idonei marcatori (CD20, CD79a, altri). Nel caso (piuttosto raro) che le cellule neoplastiche siano CD20-negative e si presenti il dubbio morfologico di neoplasie non linfoidi (carcinoma scarsamente differenziato, melanoma, altro) si può ricorrere al classico algoritmo (CD45, citocheratine, S100, HMB45, etc.) aggiornato con marcatori specifici di più recente introduzione<sup>(10-12)</sup>. La caratterizzazione di linea T o B può essere effettuata con numerosi marcatori, ma il CD20 è nettamente il preferito per la sua specificità, per l'elevata qualità dei reagenti disponibili, ed in particolare perché rappresenta anche un marcatore predittivo per la terapia con farmaci anti-CD20. È da sottolineare che nei casi trattati con farmaci anti-CD20 si possono avere risultati falsi negativi per effetto della mascheratura o scomparsa dell'antigene CD20 sulla superficie delle cellule neoplastiche. Nelle analisi di sospette recidive o monitoraggio su biopsia osteomidollare dopo trattamento è suggeribile utilizzare anche marcatori B-specifici diversi dall'anti-CD20 (ad esempio il CD79a, CD19, PAX5)<sup>(13,14)</sup>. Il CD20 è costantemente non espresso nei linfomi plasmablastici (come anche nel mieloma plasmablastico), e la caratterizzazione di queste forme prevede l'utilizzo di marcatori di differenziazione plasmacellulare (CD38, CD138, MUM1, catene leggere delle immunoglobuline), la presenza di antigeni virali (EBV, HHV8), ed una attenta valutazione clinica<sup>(15-17)</sup>.

## Linfoma a grandi cellule B NAS

Nel DLBCL B NAS le linee guida indicano l'opportunità di identificare la cellula di origine (*cell of origin* - COO, distinta in centro-germinativo-simile o GCB e in cellula B attivata o ABC). Tale distinzione è basata sugli studi di *gene-expression profiling* (GEP)<sup>(1820)</sup> che hanno individuato nell'ambito del DLBCL almeno due categorie biologiche, corrispondenti alla supposta cellula di origine (GCB o ABC). Tale distinzione ha rivelato una corrispondenza

clinica<sup>(19, 21, 22)</sup>; il sottogruppo ABC ha infatti dimostrato una prognosi peggiore con terapie tipo CHOP o R-CHOP. I due sottogruppi mostrano un profilo di mutazioni geniche in parte comune ed in parte distinto<sup>(23)</sup>. In considerazione dell'importanza della distinzione ABC-GCB e della concomitante difficoltà tecnica di esecuzione delle metodiche di GEP, numerosi studi hanno cercato di surrogare tale tecnica mediante l'utilizzo di algoritmi immunofenotipici (Figure 2 e 3)<sup>(24-31)</sup>. Sebbene quando utilizzati in un setting controllato tali algoritmi abbiano dimostrato una buona corrispon-

denza con i dati GEP, altri studi hanno mostrato una scarsa riproducibilità interlaboratorio, ed una meta-analisi ha verificato come i vari algoritmi presentino un tasso di errore eccessivo per l'applicazione clinica<sup>(22, 32-36)</sup>. In conseguenza di ciò l'uso dell'immunoistochimica è accettato ma non consigliato per decisioni cliniche<sup>(1, 37)</sup>. Parallelamente alla ricerca di surrogati immunoistochimici, si è sviluppato un filone di ricerca volto alla semplificazione delle metodiche di GEP, possibilmente applicabili anche a materiale fissato. In particolare la tecnologia *Nanostring nCounter* ha permesso a vari gruppi

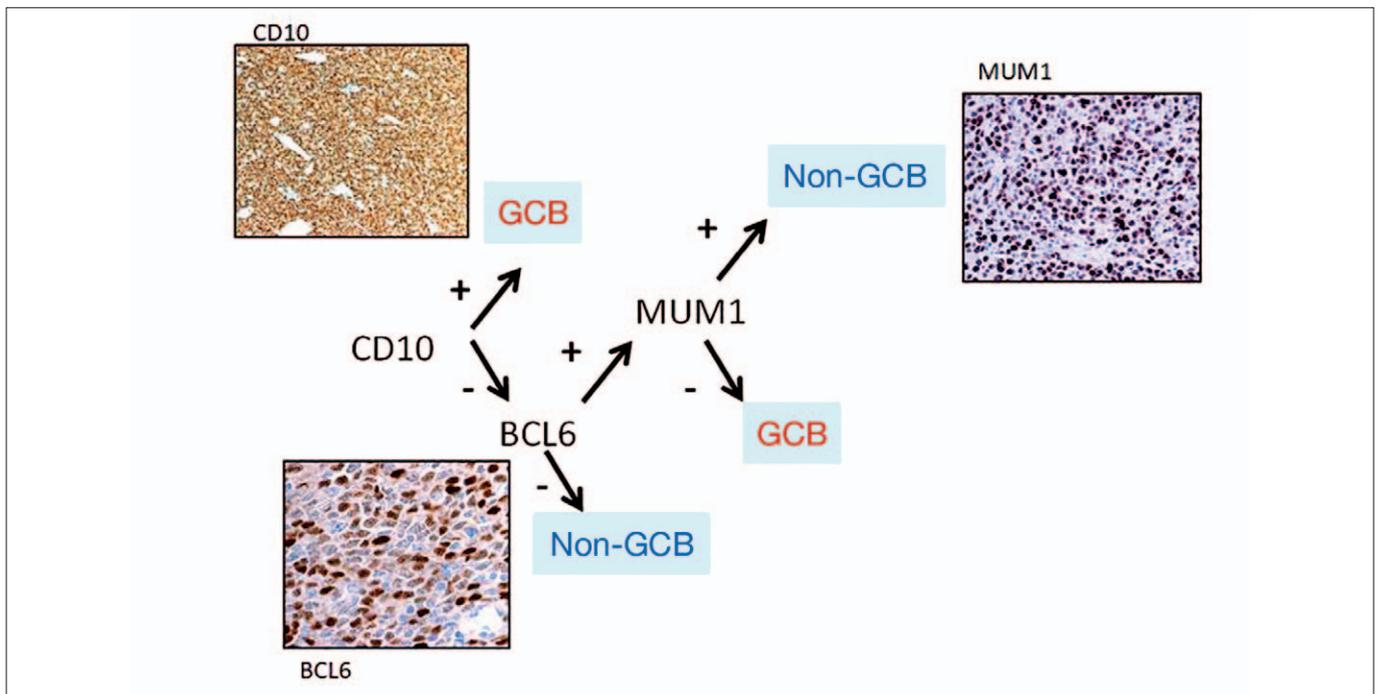


Figura 2 - Algoritmo immunofenotipico per la definizione della "cell of origin" secondo Hans<sup>[25]</sup>.

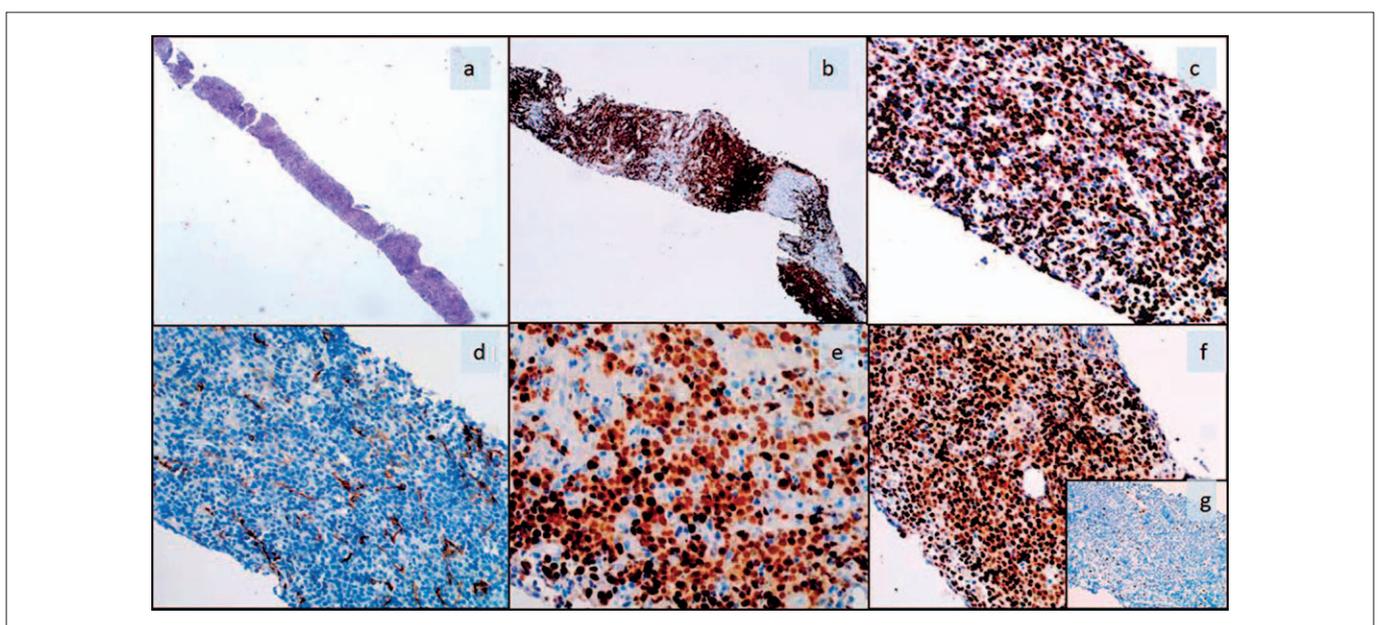


Figura 3 - Analisi morfologica e profilo immunofenotipico di un DLBCL NAS, tipo ABC, diagnosticato su massa profonda mediante ago tru-cut: a) E&E; b) CD20; c) Ki67; d) CD10; e) MUM1; f) p53; g) p21waf1.

di discriminare la COO usando materiale fissato<sup>(38-40)</sup>. Attualmente uno di questi test è proposto come test diagnostico per uso clinico (*Lymph2Cx*), con possibile riduzione della categoria dei linfomi inclassificabili ponendola generalmente nel sottogruppo GCB. Diversi studi suggeriscono che la suddivisione dei DLBCL rispetto alla *cell of origin* seguendo i criteri sopradescritti permette una più precisa stratificazione prognostica, ulteriormente implementabile con marcatori molecolari (dimostrabili anche con metodologie immunostochimiche) che raggiungono significatività solamente se valutati nel contesto di un singolo sottogruppo COO. Il loro impiego nella pratica clinica è però da definire nel contesto della discussione multidisciplinare. Il Ki67 consente di ottenere una valutazione della quota proliferante delle cellule neoplastiche: la valenza prognostica di questo marcatore appare limitata alle forme ABC o MYC+<sup>(41-45)</sup>. Elevati livelli di espressione (>80-90% delle cellule neoplastiche) caratterizzano il linfoma di Burkitt ed una quota di DLBCL. Il CD30, marcatore espresso in una significativa (10-15%) quota di linfomi caratterizzati da espressione genica distinta, ha valore prognostico positivo e rappresenta un potenziale marcatore predittivo (brentizumab)<sup>(46)</sup>. La prognosi migliore è probabilmente correlata all'evidenza che CD30 e MYC sono mutualmente esclusivi nei DLBCL<sup>(47, 48)</sup>. L'espressione di CD5 è dimostrabile nel 5% circa dei DLBCL (escludendo ovviamente forme a grandi cellule associate a B CLL o linfoma a cellule del mantello) ed è associata a prognosi peggiore<sup>(49)</sup>. La proteina p63, isoforma transattivante del gene *TP73*, è un marcatore con valenza prognostica positiva<sup>(50)</sup>. L'espressione di CD37 ha valenza prognostica positiva nei GCB-DLBCL<sup>(51)</sup>. Elevati livelli di espressione di p53 (>80% delle cellule in immunostochimica), correlano con la presenza di mutazioni e

perdita di funzione del TSG (*Tumor - suppressor - gene*) confermata dall'assenza di espressione di p21 waf1<sup>(52)</sup> e sono considerati marcatori prognostici negativi, in particolare nei DLBCL GCB<sup>(53, 54)</sup>.

## Stadiazione

In un significativo numero di casi di DLBCL è dimostrabile una localizzazione midollare di rilevante importanza clinica. Nella stadiazione è quindi prevista la verifica di presenza o assenza di localizzazione mediante biopsia osteomidollare, ma limitatamente ai casi PET-negativi<sup>(55)</sup>. Questa indicazione è opinabile alla luce dei dati che evidenziano il valore prognostico della definizione istopatologica della localizzazione: concordante (linfoma a grandi cellule) o discordante (linfoma follicolare, linfoma della zona marginale, o altro)<sup>(56-59)</sup>.

## Forme specifiche

### Ricco in linfociti T e macrofagi

È una forma di DLBCL morfologicamente peculiare, caratterizzato dalla scarsità di elementi neoplastici (evidenziabili con precisione mediante CD20 in immunostochimica), frammisti ad una esuberante popolazione linfoide T (CD3+) di accompagnamento ed un numero variabile di macrofagi CD68+ (Figura 4). La diagnosi differenziale non è sempre semplice, e comprende il linfoma di Hodgkin (in particolare la variante nodulare a predominanza linfocitaria, di cui condivide alcune caratteristiche molecolari, e di cui è probabilmente una evoluzione, almeno in alcuni casi)<sup>(60)</sup>.

Le cellule neoplastiche esprimono l'intero corredo di marcatori B-associati, e non esprimono i marcatori del linfoma di Hodgkin classico (CD30, CD15). La presenza di marcatori del virus EBV deve orientare per una differente diagnosi<sup>(61)</sup>.

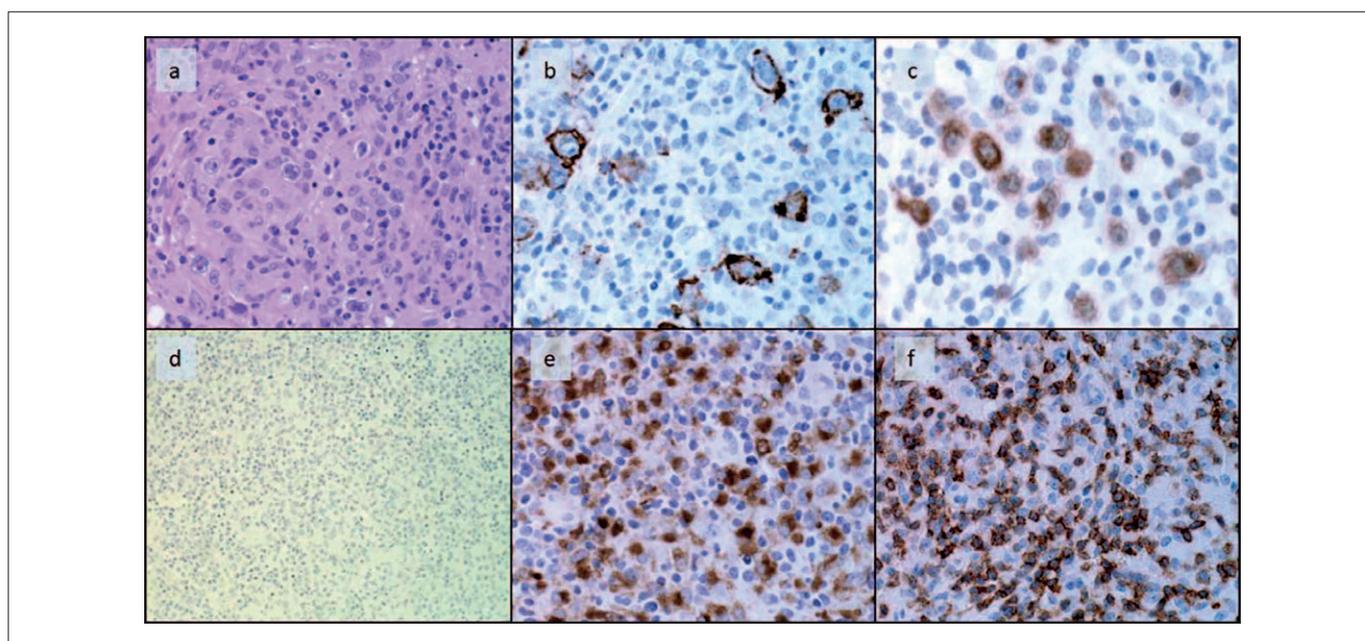


Figura 4 - Analisi morfologica e profilo immunofenotipico di un DLBCL, ricco in linfociti T e macrofagi: a) E&E; b) CD20; c) CD79a; d) CD30; e) CD68; f) CD3.

## Primitivo del sistema nervoso centrale

In questo linfoma, per definizione extra-nodale, le cellule neoplastiche infiltrano con pattern diffuso il tessuto cerebrale. Sono comuni aree necrotiche, che possono costituire in piccole biopsie l'unica evidenza della lesione. In questi casi è possibile dimostrare, indirettamente, la natura linfoide B della lesione con l'analisi immunistochemica, poiché diversi marcatori (tra cui il CD20) restano evidenziabili nelle cellule necrotiche. Il fenotipo più frequente è BCL6+, MUM1+, CD10-negatività, elevato indice di proliferazione ed assenza di EBV. La co-espressione di BCL2 e MYC è segnalata come fattore prognostico negativo, indipendentemente dalla COO <sup>(62)</sup>.

## Primitivo della cute, tipo “gamba”

Raro linfoma cutaneo dell'anziano particolarmente aggressivo in assenza di terapia, caratterizzato da COO di tipo ABC e fenotipo BCL2+, MUM1+, FOXP1+ e MYC+, p63+, negativo per CD10 <sup>(63)</sup>.

## EBV-positivo, NAS

Questo linfoma, precedentemente denominato dell'anziano, è attualmente definito come NAS in quanto può insorgere anche in pazienti giovani, immunocompetenti. È tipicamente caratterizzato dalla presenza di marcatori di infezione di EBV, in particolare il test EBER (EBV-*encoded small RNA*) <sup>(64)</sup>. Va distinto da altre forme EBV+ più specifiche (linfoma plasmablastico, DLBCL associato ad infiammazione cronica, ulcera mucocutanea). La morfologia delle cellule neoplastiche è spesso pleomorfa, e la diagnosi differenziale è complessa. Spesso si osserva espressione di CD30, ma l'espressione costante ed intensa di marcatori B (CD20, CD79a) distingue questo linfoma dal linfoma di Hodgkin classico.

## Ulcera mucocutanea EBV-positiva

Entità clinico-patologica di recente introduzione nella classificazione, è caratterizzata da morfologia fortemente atipica, ma scarsa aggressività. È patogeneticamente associata a stati di immunodeficienza iatrogenica o da senescenza <sup>(65, 66)</sup>.

Frequente nella mucosa orale, cute, tratto gastrointestinale, si presenta in assenza di linfadenopatia o segni sistemici. Le cellule atipiche, caratterizzate da fenotipo B CD30+ (negative per CD10 e BCL6) e per definizione EBV-positiva (EBER+), infiltrano la mucosa ulcerata frammiste a numerosi linfociti T e macrofagi.

## Associato a infiammazione cronica

Rara neoplasia EBV-positiva associata ad infiammazione cronica. La forma più comune è il linfoma associato a pitorace di lunga durata <sup>(67)</sup>. La patogenesi è presumibilmente correlata alla perdita di sorveglianza immunitaria, localizzata in ambiti microambientali peculiari (spazi isolati). Le cellule neoplastiche, a fisionomia centroblastica o immunoblastica, sono caratterizzate da fenotipo B (CD20, CD79a), con espressione di marcatori plasmacellulari (CD138, MUM1), talvolta CD30+.

## Granulomatosi Linfomatoide

Linfoma extranodale EBV correlato, caratterizzato da morfologia angiocentrica. La sede prevalentemente colpita è il polmone. Le cellule neoplastiche sono di natura B CD20+, frammiste ad un infiltrato linfoide T CD8+, spesso predominante. La quantità relativa di cellule neoplastiche CD20+ rispetto all'infiltrato reattivo è variabile e clinicamente significativa: si sono individuati tre gradi, dove il terzo è caratterizzato dalla presenza di numerosi elementi atipici (5-20 x CFI). I casi in cui l'infiltrato è modesto/assente e la proliferazione è diffusa si considerano DLBCL EBV+, NAS <sup>(68)</sup>.

## Primitivo del mediastino

Linfoma B aggressivo, relativamente raro che colpisce soggetti giovani con prevalenza femminile. Si considera originare dalle cellule linfoidi B della midollare timica <sup>(69)</sup>. La diagnosi precoce è cruciale in quanto nei casi localizzati, adeguatamente trattati, la frequenza di guarigione è nettamente superiore rispetto ai casi con diffusione extra-mediastinica <sup>(70, 71)</sup>. Le caratteristiche molecolari e immunofenotipiche sono peculiari <sup>(8, 72)</sup>. Alcuni marcatori frequentemente espressi in questo linfoma sono utili nella diagnosi differenziale (CD30, TAp63, CD23, TRAF1, CD200, MAL) <sup>(73-76)</sup>. Limitarsi nella diagnosi al solo CD20 può portare ad errori (ad es. su piccole biopsie con artefatti) a causa dell'espressione anomala del marcatore in alcuni timomi <sup>(77)</sup>.

## Intravascolare

In questo peculiare tipo di linfoma le cellule neoplastiche si localizzano esclusivamente in sede endovascolare. La diagnosi è particolarmente difficile su base morfologica e la dimostrazione di elementi linfoidi atipici CD20+ isolati o in piccoli aggregati lineari all'interno dei vasi è fondamentale per porre la diagnosi corretta. Il profilo immunofenotipico è eterogeneo, con possibile espressione di CD5 <sup>(78)</sup>. Il quadro intravascolare delle localizzazioni midollari di linfoma a cellule della zona marginale splenica non deve essere confuso con il linfoma intravascolare, molto più aggressivo.

## DLBCL ALK1+

La dimostrazione immunistochemica di ALK, confermata dall'evidenza di una traslocazione del locus ALK sul cromosoma 2 - la più frequente è t(2;17)(p23;q23) - con metodo FISH permette di diagnosticare questo raro linfoma B aggressivo. Ha spesso morfologia immunoblastica e immunofenotipo coerente con la differenziazione secretiva (espressione di CD138, MUM1, EMA, restrizione dell'espressione di catene leggere, negatività per antigeni B-associati: CD20, CD79a, PAX5 <sup>(79)</sup>).

## Linfoma plasmablastico

È un linfoma spesso associato a stati di immunodeficienza, caratterizzato da morfologia immunoblastica e/o plasmablastica. Va distinto dalle forme ALK positive, dai linfomi associati ad infezione

HHV8, e dal mieloma plasmablastico<sup>(17)</sup>. Un'accurata valutazione clinico-anamnestica è fondamentale per questa diagnosi differenziale. È frequente la dimostrazione di infezione da EBV (dimostrabile con analisi EBER), assente nel mieloma. Può presentarsi come nodale o extranodale. Il profilo immunofenotipico evidenzia l'espressione di marcatori plasmacellulari (CD138, MUM1) (Figura 5)<sup>(15)</sup> e l'assenza di marcatori B-associati.

L'anomala espressione di CD3 osservata in alcuni casi in assenza di CD20, può indurre in errori diagnostici<sup>(80)</sup>.

### Linfoma primitivo effusivo

Questo raro linfoma si presenta come effusivo (a livello pleurico, pericardico o peritoneale), con possibile diffusione extracavitaria e formazione di masse. È associato a condizioni di immunodeficienza (HIV+, trapianti d'organo), ma può insorgere, raramente, nell'anziano immunocompetente. È in tutti i casi dimostrabile la presenza di virus Herpes 8, e frequentemente la co-infezione da EBV. La diagnosi si pone su prelievi citologici (citocentrifugato) o su *tissue-block* con accurata analisi immunofenotipica<sup>(81)</sup>.

### DLBCL HHV8-positivo, NAS

Stati di immunodeficienza sono associati ad uno spettro di processi linfoproliferativi correlati all'infezione del virus HHV8. Comprendono la malattia di Castleman ed il DLBCL HHV8-

positivo, NAS. Quest'ultima entità, che può entrare in diagnosi differenziale con il DLBCL NAS, è caratterizzata da cellule a fisionomia plasmablastica che producono immunoglobuline IgM, sono EBV-negative (a differenza del PEL), e per definizione HHV8-positivo.

### DLBCL - DH/TH

Gruppo eterogeneo e complesso di forme con caratteristiche cliniche e patologiche intermedie tra DLBCL NAS e linfoma di Burkitt. In questa categoria rientrano i linfomi definiti come (double/triple hit - DH/TH) per la presenza di multiple anomalie cromosomiche (*BCL2*, *BCL6*, *MYC*). Questo sottogruppo particolare di DLBCL, attualmente considerato una categoria distinta, comprende casi in cui è identificabile (in genere tramite FISH) la traslocazione del gene *MYC* (indipendentemente dal partner di fusione) e simultaneamente di *BCL2* e/o *BCL6*. I partner di fusione possono essere loci delle immunoglobuline o altri.

Sebbene sia ben noto il contributo del gene *MYC* alla proliferazione cellulare non è chiaro se gli altri geni coinvolti nelle traslocazioni abbiano un ruolo patogenetico diretto o rappresentino la spia di una marcata instabilità genomica. In ogni caso i DLBCL DH/TH hanno in generale una prognosi peggiore rispetto ai DLBCL NAS<sup>(82, 83)</sup>. Anche in questo caso alcuni studi hanno cercato di correlare i re-

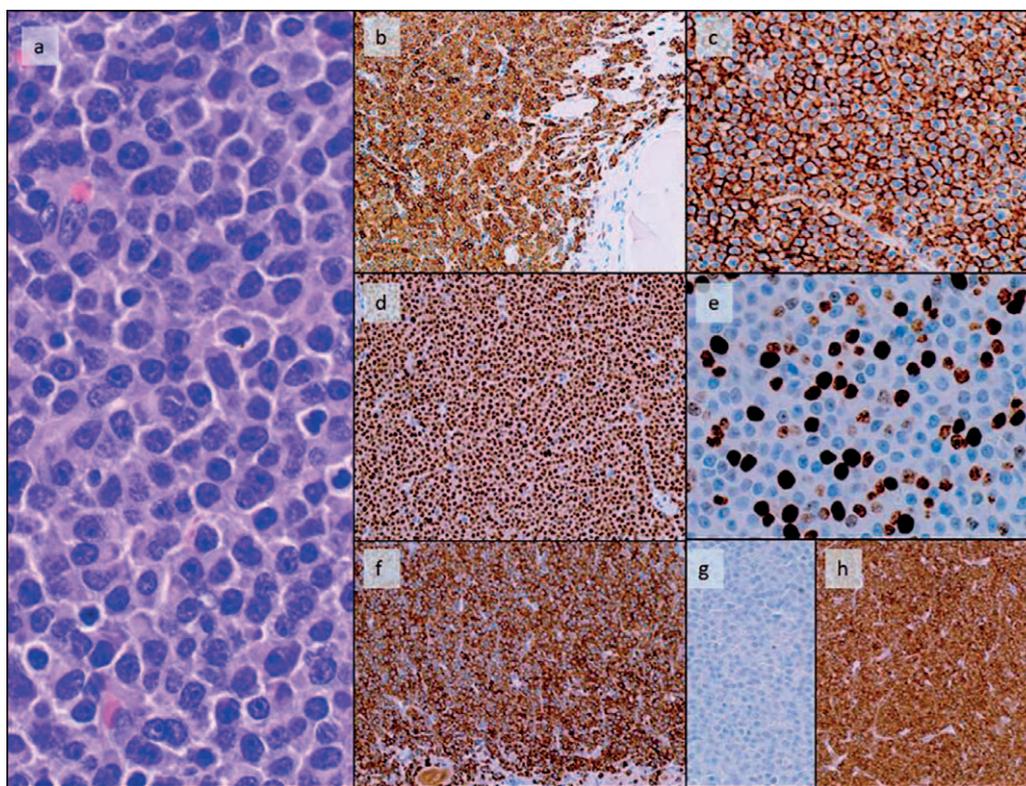


Figura 5 - Morfologia e profilo immunofenotipico di un caso di DLBCL plasmablastico: a) aspetto morfologico (E&E); b) CD79a; c) CD138; d) MUM1; e) Ki67; f) BCL2; g) catena leggera lambda; h) catena leggera kappa.

perti FISH con l'espressione immunostochimica delle corrispondenti proteine <sup>(84)</sup>.

Sebbene sia possibile stabilire una correlazione (ad es. casi con MYC>70% hanno una elevata probabilità di essere portatori della traslocazione), tuttavia essa non è assoluta. Gli studi immunostochimici hanno però portato ad individuare la categoria (non nosologica) dei DLBCL doppi espressori (*dual expressor*, DE) che sembrano comunque avere prognosi peggiore rispetto ai DLBCL non-DE. Per DE si intende un DLBCL con concomitante espressione di MYC e di BCL2 in immunostochimica <sup>(44)</sup>. In sintesi il quadro è molto complesso, ed ulteriormente complicato dal fatto che esistono casi morfologicamente DLBCL che presentano profilo di GEP indistinguibile dai linfomi di Burkitt (e definiti perciò linfomi di Burkitt molecolari o *molecular Burkitt*).

I casi morfologicamente e fenotipicamente simili, ma privi delle anomalie cromosomiche, vengono definiti nell'attuale classificazione come linfomi di alto grado, NAS. Questi linfomi rappresentano solo 5-6% dei linfomi a grandi cellule e non è ancora chiaro il rapporto costo/beneficio della loro precisa identificazione.

### DLBCL inclassificabili

In alcuni casi di DLBCL si osservano aspetti morfologici e immunofenotipici analoghi a quanto osservato nel linfoma di Hodgkin classico. Le cellule atipiche possono infatti dimostrare, oltre all'espressione di CD30, anche CD15 e spiccata anaplasia citomorfologica. In questa categoria, che può presentare notevoli difficoltà diagnostiche, possono ricadere presentazioni inusuali del linfoma primitivo del mediastino ed anche casi di linfoma di Hodgkin classico a deplezione linfocitaria.

### Bibliografia

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
2. Quintanilla-Martinez L. The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias. *Hematol Oncol*. 2017;35 Suppl 1:37-45.
3. AIOM. Linee guida linfomi 2017. <http://www.aiom.it/professionisti/documenti-scientifici/linee-guida/linfomi/1,720,1>
4. Nunez AL, Jhala NC, Carroll AJ, Mikhail FM, Reddy VV, Xian RR, et al. Endoscopic ultrasound and endobronchial ultrasound-guided fine-needle aspiration of deep-seated lymphadenopathy: Analysis of 1338 cases. *Cytojournal*. 2012;9:14.
5. Cozzolino I, Varone V, Picardi M, Baldi C, Memoli D, Ciancia G, et al. CD10, BCL6, and MUM1 expression in diffuse large B-cell lymphoma on FNA samples. *Cancer Cytopathol*. 2016;124(2):135-43.
6. Ries S, Barr R, LeBoit P, McCalmont T, Waldman J. Cutaneous sarcomatoid B-cell lymphoma. *Am J Dermatopathol*. 2007;29(1):96-8.
7. Wang J, Sun NC, Nozawa Y, Arber DA, Chu P, Chang KL, et al. Histological and immunohistochemical characterization of extranodal diffuse large-cell lymphomas with prominent spindle cell features. *Histopathology*. 2001;39(5):476-81.
8. Menestrina F, Chilosi M, Bonetti F, Lestani M, Scarpa A, Novelli P, et al. Mediastinal large-cell lymphoma of B-type, with sclerosis: histopathological and immunohistochemical study of eight cases. *Histopathology*. 1986;10(6):589-600.
9. Möller P, Moldenhauer G, Momburg F, Lämmler B, Eberlein-Gonska M, Kiesel S, et al. Mediastinal lymphoma of clear cell type is a tumor corresponding to terminal steps of B cell differentiation. *Blood*. 1987;69(4):1087-95.
10. Pizzolo G, Sloane J, Beverley P, Thomas JA, Bradstock KF, Mattingly S, et al. Differential diagnosis of malignant lymphoma and nonlymphoid tumors using monoclonal anti-leucocyte antibody. *Cancer*. 1980;46(12):2640-7.
11. Mason DY, Gatter KC. The role of immunocytochemistry in diagnostic pathology. *J Clin Pathol*. 1987;40(9):1042-54.
12. Stelow EB, Yaziji H. Immunohistochemistry, carcinomas of unknown primary, and incidence rates. *Semin Diagn Pathol*. 2018;35(2):143-152.
13. Davis TA, Czerwinski DK, Levy R. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res*. 1999;5(3):611-5.
14. Foran JM, Norton AJ, Micallef IN, Taussig DC, Amess JA, Rohatiner AZ, et al. Loss of CD20 expression following treatment with rituximab (chimaeric monoclonal anti-CD20): a retrospective cohort analysis. *Br J Haematol*. 2001;114(4):881-3.
15. Chilosi M, Adami F, Lestani M, Montagna L, Cimarosto L, Semenzato G, et al. CD138/syndecan-1: a useful immunohistochemical marker of normal and neoplastic plasma cells on routine trephine bone marrow biopsies. *Mod Pathol*. 1999(12):1101-6.
16. Colomo L, Loong F, Rives S, Pittaluga S, Martínez A, López-Guillermo A, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am J Surg Pathol*. 2004;28(6):736-47.
17. Vega F, Chang CC, Medeiros LJ, Udden MM, Cho-Vega JH, Lau CC, et al. Plasmablastic lymphomas and plasmablastic plasma cell myelomas have nearly identical immunophenotypic profiles. *Mod Pathol*. 2005;18(6):806-15.
18. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503-11.
19. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-47.
20. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(17):9991-6.
21. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-23.
22. Gutiérrez-García G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, González-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood* 2011;117(18):4836-4843.
23. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol*. 2015;52(2):67-76.
24. Colomo L, López-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martínez A, Bosch F, et al. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2003;101(1):78-84.
25. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-82.
26. Muris JJ, Meijer CJ, Vos W, van Krieken JH, Jiwa NM, Ossenkoppele GJ, et al. Immunohistochemical profiling based on Bcl-2, CD10 and MUM1 expression improves risk stratification in patients with primary nodal diffuse large B-cell lymphoma. *J Pathol* 2006;208(15):714-23.

27. Choi WW, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5494-502.
28. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML, Taskinen M, Berglund M, Amini RM et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood* 2007;109(11):4930-35.
29. Natkunam Y, Farinha P, Hsi ED, Hans CP, Tibshirani R, Sehn LH, et al. LMO2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with anthracycline-based chemotherapy with and without rituximab. *J Clin Oncol* 2008;26(3):447-54.
30. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol* 2011;29(2):200-7.
31. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International LDGCB Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*. 2012;26(9):2103-13.
32. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications—a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol* 2007;25(7):805-12.
33. Coutinho R, Clear AJ, Owen A, Wilson A, Matthews J, Lee A, et al. Poor concordance among nine immunohistochemistry classifiers of cell-of-origin for diffuse large B-cell lymphoma: implications for therapeutic strategies. *Clin Cancer Res* 2013;19(24):6686-95.
34. Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd HW, et al. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood* 2010;116(23):4916-25.
35. Hwang HS, Park CS, Yoon DH, Suh C, Huh J. High concordance of gene expression profiling-correlated immunohistochemistry algorithms in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(8):1046-57.
36. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating cell-of-origin subtype methods for predicting diffuse large B-cell lymphoma survival: a meta-analysis of gene expression profiling and immunohistochemistry algorithms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014;14(6):460-67.
37. Ladetto M, Buske C, Hutchings M, Dreyling M, Gaidano G, Le Gouill S, et al. ESMO consensus conference on malignant lymphoma: general perspectives and recommendations for prognostic tools in mature B-cell lymphomas and chronic lymphocytic leukaemia. *Ann Oncol*. 2016;27(12):2149-60.
38. Masqué-Soler N, Szczepanowski M, Kohler CW, Spang R, Klapper W. Molecular classification of mature aggressive B-cell lymphoma using digital multiplexed gene expression on formalin-fixed paraffin-embedded biopsy specimens. *Blood* 2013;122(11):1985-6.
39. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih CJ, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin embedded tissue. *Blood* 2014;123(8):1214-7.
40. Veldman-Jones MH, Lai Z, Wappett M, Harbron CG, Barrett JC, Harrington EA et al. Reproducible, quantitative, and flexible molecular subtyping of clinical LDGCB samples using the NanoString nCounter System. *Clin Cancer Res* 2015;21(10):2367-78.
41. Haralambieva E, Boerma EJ, van Imhoff GW, Rosati S, Schuurings E, Müller-Hermelink HK, et al. Clinical, immunophenotypic, and genetic analysis of adult lymphomas with morphologic features of Burkitt lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(8):1086-94.
42. Li ZM, Huang JJ, Xia Y, Zhu YJ, Zhao W, Wei WX, et al. High Ki-67 expression in diffuse large B-cell lymphoma patients with non-germinal center subtype indicates limited survival benefit from R-CHOP therapy. *Eur J Haematol*. 2012;88(6):510-7.
43. Huang JJ, Xia Y, Wang Y, Liu PB, Bi XW, Sun P, et al. A comparison of R-EPOCH and R-CHOP as a first-line regimen in de novo LDGCB patients with high Ki-67 expression in a single institution. *Oncotarget*. 2016;7(27):41242-41250.
44. Agarwal R, Lade S, Liew D, Rogers TM, Byrne D, Feleppa F, et al. Role of immunohistochemistry in the era of genetic testing in MYC-positive aggressive B-cell lymphomas: a study of 209 cases. *J Clin Pathol*. 2016;69(3):266-70.
45. Koh YW, Hwang HS, Park CS, Yoon DH, Suh C, Huh J. Prognostic effect of Ki-67 expression in rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone-treated diffuse large B-cell lymphoma is limited to non-germinal center B-cell-like subtype in late-elderly patients. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(9):2630-6.
46. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, Manyam GC, Visco C, Tzankov A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International LDGCB Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013;121(14):2715-24.
47. Wang XJ, Seegmiller AC, Reddy NM, Li S. CD30 expression and its correlation with MYC rearrangement in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2016;97(1):39-47.
48. Xu J, Oki Y, Saksena A, Desai P, Lin P, Tang G, et al. CD30 expression and prognostic significance in R-EPOCH-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol* 2017;60:160-6.
49. Xu-Monette ZY, Tu M, Jabbar KJ, Cao X, Tzankov A, Visco C, et al. Clinical and biological significance of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Oncotarget*. 2015;6(8):5615-33.
50. Xu-Monette ZY, Zhang S, Li X, Manyam GC, Wang XX, Xia Y, et al. p63 expression confers significantly better survival outcomes in high-risk diffuse large B-cell lymphoma and demonstrates p53-like and p53-independent tumor suppressor function. 2016;8(2):345-65.
51. Xu-Monette ZY, Li L, Byrd JC, Jabbar KJ, Manyam GC, Maria de Winde C, et al. Assessment of CD37 B-cell antigen and cell of origin significantly improves risk prediction in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2016;128(26):3083-100.
52. Chilosi M, Doglioni C, Magalini A, Inghirami G, Krampera M, Nadali G, et al. p21/WAF1 cyclin-kinase inhibitor expression in non-Hodgkin's lymphomas: a potential marker of p53 tumor-suppressor gene function. *Blood*. 1996;88(10):4012-20.
53. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, Kato H, Nagai H, Tsushita K, et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1997;337(8):529-34.
54. Visco C, Canal F, Parolini C, Andreoli A, Ambrosetti A, Krampera M, et al. The impact of P53 and P21(waf1) expression on the survival of patients with the germinal center phenotype of diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*. 2006;91(5):687-90.
55. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-68.
56. Chung R, Lai R, Wei P, Lee J, Hanson J, Belch AR, et al. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood*. 2007;110(4):1278-82.
57. Sehn LH, Scott DW, Chhanabhai M, Berry B, Ruskova A, Berkahn L, et al. Impact of concordant and discordant bone marrow involvement on outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Oncol*. 2011;29(11):1452-7.
58. Shim H, Oh JI, Park SH, Jang S, Park CJ, Huh J, et al. Prognostic impact of concordant and discordant cytomorphology of bone marrow involvement in patients with diffuse, large, B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *J Clin Pathol*. 2013;66(5):420-5.
59. Yao Z, Deng L, Xu-Monette ZY, Manyam GC, Jain P, Tzankov A, et al. Concordant bone marrow involvement of diffuse large B-cell lymphoma represents a distinct clinical and biological entity in the era of immunotherapy. *Leukemia*. 2018;32(2):353-363.

60. Hartmann S, Döring C, Vucic E, Chan FC, Ennishi D, Tousseyn T, et al. Array comparative genomic hybridization reveals similarities between nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma and T cell/histiocyte rich large B cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2015;169(3):415-22.
61. Tousseyn T, De Wolf-Peeters C. T cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma: an update on its biology and classification. *Virchows Arch.* 2011;459(6):557-63.
62. Shi QY, Feng X, Bao W, Ma J, Lv JH, Wang X, et al. MYC/BCL2 Co-Expression Is a Stronger Prognostic Factor Compared With the Cell-of-Origin Classification in Primary CNS LDGCB. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017;76(11):942-48.
63. Grange F, Beylot-Barry M, Courville P, Maubec E, Bagot M, Vergier B, et al. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type: clinicopathologic features and prognostic analysis in 60 cases. *Arch Dermatol.* 2007;143(9):1144-50.
64. Nicolae A, Pittaluga S, Abdullah S, Steinberg SM, Pham TA, Davies-Hill T, et al. EBV-positive large B-cell lymphomas in young patients: a nodal lymphoma with evidence for a tolerogenic immune environment. *Blood.* 2015;126(7):863-72.
65. Dojcinov SD, Venkataraman G, Raffeld M, Pittaluga S, Jaffe ES. EBV positive mucocutaneous ulcer—a study of 26 cases associated with various sources of immunosuppression. *Am J Surg Pathol.* 2010;34(3):405-17.
66. Hart M, Thakral B, Yohe S, Balfour HH Jr, Singh C, Spears M, et al. EBV-positive mucocutaneous ulcer in organ transplant recipients: a localized indolent posttransplant lymphoproliferative disorder. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(11):1522-9.
67. Nakatsuka S, Yao M, Hoshida Y, Yamamoto S, Iuchi K, Aozasa K. Pyothorax-associated lymphoma: a review of 106 cases. *J Clin Oncol.* 2002;20(20):4255-60.
68. Song JY, Pittaluga S, Dunleavy K, Grant N, White T, Jiang L, et al. Lymphomatoid granulomatosis—a single institute experience: pathologic findings and clinical correlations. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(2):141-56.
69. Addis BJ, Isaacson PG. Large cell lymphoma of the mediastinum: a B-cell tumour of probable thymic origin. *Histopathology.* 1986;10(4):379-90.
70. Cazals-Hatem D, Lepage E, Brice P, Ferrant A, d'Agay MF, Baumelou E, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma. A clinicopathologic study of 141 cases compared with 916 nonmediastinal large B-cell lymphomas, a GELA ("Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte") study. *Am J Surg Pathol.* 1996;20(7):877-88.
71. Todeschini G, Secchi S, Morra E, Vitolo U, Orlandi E, Pasini F, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMLBCL): long-term results from a retrospective multicentre Italian experience in 138 patients treated with CHOP or MACOP-B/VACOP-B. *Br J Cancer.* 2004;90(2):372-6.
72. Yousem SA, Weiss LM, Warnke RA. Primary mediastinal non-Hodgkin's lymphomas: a morphologic and immunologic study of 19 cases. *Am J Clin Pathol.* 1985; 83(6):676-80.
73. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberger D, De Leval L, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2003;102(12):3871-9.
74. Zamò A, Malpeli G, Scarpa A, Doglioni C, Chilosi M, Menestrina F. Expression of TP73L is a helpful diagnostic marker of primary mediastinal large B-cell lymphomas. *Mod Pathol.* 2005;18(11):1448-53.
75. Rodig SJ, Savage KJ, LaCasce AS, Weng AP, Harris NL, Shipp MA, et al. Expression of TRAF1 and nuclear c-Rel distinguishes primary mediastinal large cell lymphoma from other types of diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2007;31(1):106-12.
76. Dorfman DM, Shahsafaei A, Alonso MA. Utility of CD200 immunostaining in the diagnosis of primary mediastinal large B cell lymphoma: comparison with MAL, CD23, and other markers. *Mod Pathol.* 2012;25(12):1637-43.
77. Chilosi M, Castelli P, Martignoni G, Pizzolo G, Montresor E, Facchetti F, et al. Neoplastic epithelial cells in a subset of human thymomas express the B cell-associated CD20 antigen. *Am J Surg Pathol.* 1992;16(10):988-97.
78. Murase T, Yamaguchi M, Suzuki R, Okamoto M, Sato Y, Tamaru J, et al. Intravascular large B-cell lymphoma (IVLBCL): a clinicopathologic study of 96 cases with special reference to the immunophenotypic heterogeneity of CD5. *Blood.* 2007; 109(2):478-85.
79. Delsol G, Lamant L, Mariamé B, Pulford K, Dastugue N, Brousset P, et al. A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation. *Blood.* 1997;89(5):1483-90.
80. Pan Z, Chen M, Zhang Q, Wang E, Yin L, Xu Y, et al. CD3-positive plasmablastic B-cell neoplasms: a diagnostic pitfall. *Mod Pathol.* 2018 Jan 12.
81. Ascoli V, Lo-Coco F. Body cavity lymphoma. *Curr Opin Pulm Med.* 2002;8 (4):317-22.
82. Li S, Desai P, Lin P, Yin CC, Tang G, Wang XJ, et al. MYC/BCL6 double-hit lymphoma (DHL): a tumour associated with an aggressive clinical course and poor prognosis. *Histopathology.* 2016;68(7):1090-8.
83. Staiger AM, Ziepert M, Horn H, Scott DW, Barth TFE, Bernd HW, et al; Clinical Impact of the Cell-of-Origin Classification and the MYC/ BCL2 Dual Expresser Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated Within Prospective Clinical Trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2017;35(22):2515-26.
84. Swerdlow SH. Diagnosis of "double hit" diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between LDGCB and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2014;2014(1):90-9.

## Parole Chiave

Linfomi diffusi a grandi cellule, istopatologia, diagnosi, prognosi

## Indirizzi per la corrispondenza

*Marco Chilosi*

Anatomia Patologica, Ospedale P. Pederzoli, Via Monte Baldo 24

Tel: 045 6449111

Peschiera del Garda, 37019 Verona, Italia

E-mail: marco.chilosi@univr.it

# Patogenesi



Marco Fangazio<sup>1</sup>, Riccardo Dalla-Favera<sup>1,2,3,4,5</sup>

<sup>1</sup> Institute for Cancer Genetics, Columbia University, New York, New York, USA.

<sup>2</sup> Department of Pathology and Cell Biology, Columbia University, New York, New York, USA.

<sup>3</sup> Department of Genetics & Development, Columbia University, New York, New York, USA.

<sup>4</sup> Department of Microbiology & Immunology, Columbia University, New York, New York, USA.

<sup>5</sup> Herbert Irving Comprehensive Cancer Center, Columbia University, New York, New York, USA.

## Introduzione

Il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) è la neoplasia linfoide dell'adulto più diffusa nel mondo occidentale e rappresenta il 30-40% di tutte le nuove diagnosi di linfoma non-Hodgkin (LNH). Il DLBCL può insorgere *de novo* o, meno frequentemente, può essere frutto dell'evoluzione clinica di diversi linfomi B indolenti. Sebbene grazie all'utilizzo dell'immuno-chemioterapia sia possibile ottenere la remissione clinica della malattia in una buona percentuale dei pazienti, in circa il 30% di essi il DLBCL è refrattario a ogni regime immuno-chemioterapico o si ripresenta dopo una risposta iniziale con una malattia resistente alle terapie tutt'oggi disponibili. Una spiegazione di questo insuccesso terapeutico deriva dalla notevole eterogeneità di questo tumore.

Il DLBCL comprende multipli differenti sottotipi molecolari che possono essere distinti dal diverso profilo trascrizionale; questi riflettono il diverso arresto maturativo del linfocita B normale causato da alterazioni che determinano la trasformazione maligna che si verificano a vari stadi del transito nel centro germinativo (GC) dal quale origina la malattia e riflettono l'attività di diversi programmi biologici. I sottotipi di DLBCL differiscono nelle vie di segnalazione cellulare che determinano lo sviluppo della malattia stessa, ma anche nella risposta ai trattamenti immuno-chemioterapici attualmente disponibili. Per questo motivo lo studio e il riconoscimento delle alterazioni dei geni e dei programmi biologici che sono essenziali per lo sviluppo e la crescita del linfoma sono fondamentali per lo sviluppo di terapie indirizzate a colpire la causa della malattia.

## Il centro germinativo

Nel midollo osseo i linfociti B ricombinano i geni che codificano per la regione variabile delle immunoglobuline (Ig) (*VDJ-recombination*); qualora questo processo dia esito ad un riarrangiamento produttivo, la cellula B esprimerà un'Ig di superficie funzionale. A questo punto il linfocita B, definito a questo stadio maturativo *naïve* in quanto non ancora attivato da un antigene, migra dal mi-

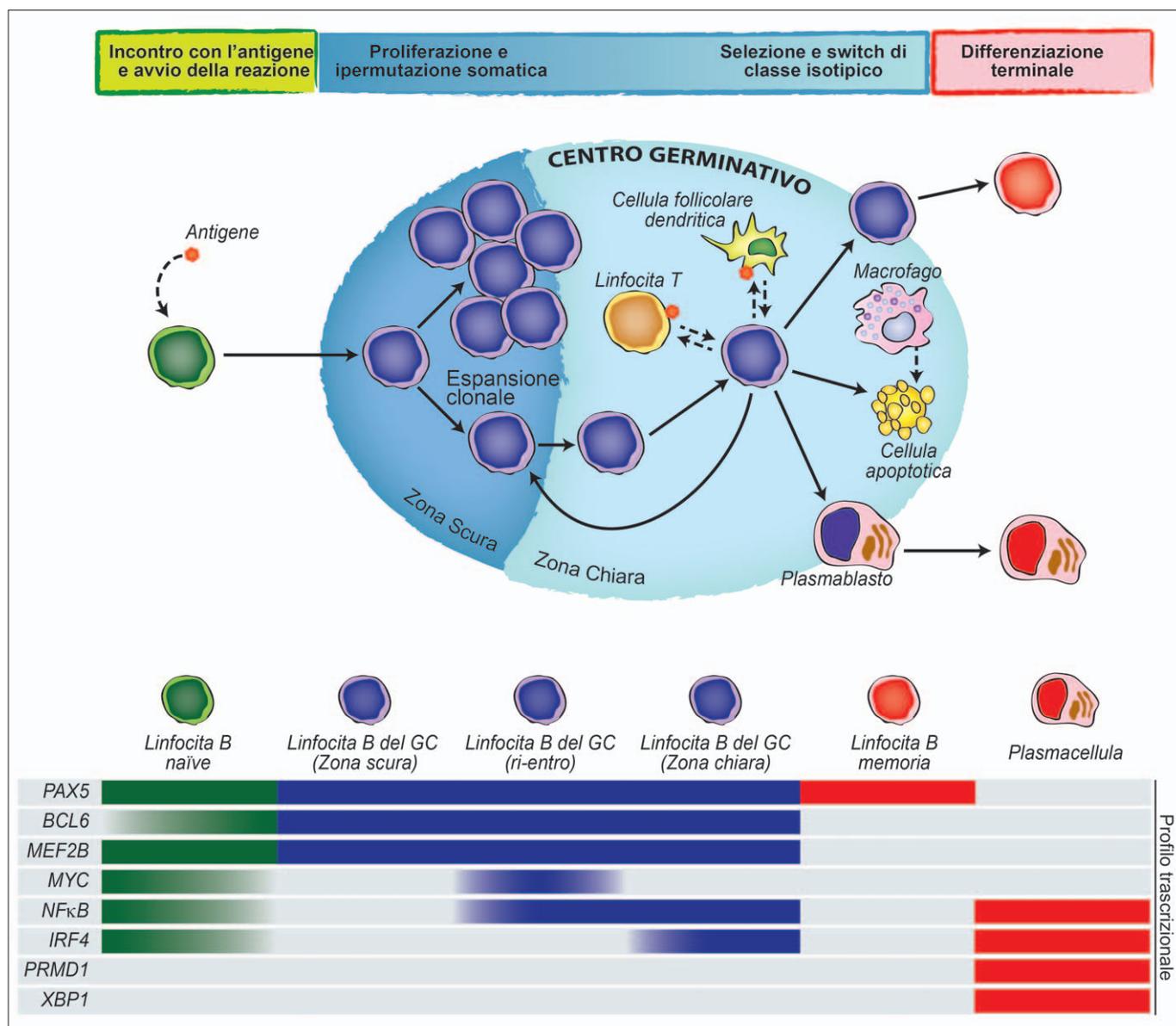
dollo osseo agli organi linfoidi secondari. Qui la cellula B incontra l'antigene e, nell'area del tessuto linfoide ricca in cellule T, viene attivata a seguito dell'interazione con i linfociti T CD4+ e si aggrega in follicolo primario per dar vita alla formazione del GC<sup>(1)</sup>. Nel GC le cellule B sono soggette a due processi di rimodellazione genica ai danni dei geni delle Ig: l'ipermutazione somatica (SHM) e lo *switch* isotipico (CSR). Queste reazioni hanno lo scopo di generare linfociti B capaci di produrre Ig ad alta affinità per l'antigene e di differenti classi isotipiche<sup>(2,3)</sup>. Ultimata la maturazione, dal GC escono plasmacellule e linfociti B memoria. La struttura del GC, sulla base delle classiche definizioni istologiche, si divide in zona scura (*dark zone*, DZ) che contiene quasi esclusivamente linfociti B proliferanti, e zona chiara (*light zone*, LZ) dove le cellule B sono mescolate a cellule dendritiche follicolari, linfociti T e macrofagi<sup>(1,4-6)</sup> (Figura 1). Questa polarizzazione non è soltanto fisica, ma anche funzionale; la DZ è sito di divisione cellulare e SHM, mentre la LZ è ove i linfociti B vengono selezionati sulla base delle affinità delle Ig espresse in seguito all'interazione con linfociti T helper CD4+ e cellule follicolari dendritiche<sup>(4,7-9)</sup>. Il processo maturativo dei linfociti B non segue però una traiettoria unidirezionale tra queste due zone, ma richiede cicli di ri-entrata durante i quali le cellule B del GC, in seguito alla selezione che avviene nella LZ, ritornano nella DZ per ulteriori turni di SHM e divisione cellulare<sup>(1)</sup>. Questi movimenti sono finemente regolati e controllati da geni e programmi di segnalazione cellulare che vengono attivati a precisi stadi di maturazione del linfocita B nel GC. Qui di seguito analizziamo brevemente i principali fattori coinvolti nello sviluppo e maturazione del GC che sono affetti da alterazioni durante la linfomagenesi.

L'oncogene *MYC* ha un profilo di espressione bi-modale: la sua espressione è indotta durante la formazione iniziale del GC, in seguito viene represso a livello trascrizionale nei linfociti B della DZ ed infine viene transitoriamente ri-espresso nei linfociti B della LZ che sono destinati a ri-entrare nella DZ<sup>(10,11)</sup>. Il ruolo dell'espressione di *MYC* durante la formazione del GC è da ricer-

carsi nella funzione di induzione e amplificazione di programmi trascrizionali associati a proliferazione cellulare, stimolazione del metabolismo e replicazione del DNA <sup>(12-14)</sup>. La repressione dell'espressione di *MYC* è dovuta all'azione del repressore trascrizionale *BCL6* la cui espressione è a sua volta regolata da altri fattori, tra cui *IRF8*, *IRF4* e *MEF2B* <sup>(10, 15-19)</sup>.

L'espressione di *BCL6* e il controllo della trascrizione genica da quest'ultimo esercitato è ciò che guida, regola e controlla la formazione e il mantenimento del GC <sup>(20)</sup>. L'attività di repressione della trascrizione esercitata da *BCL6*, che coinvolge peraltro il suo stesso pro-

motore determinando quindi autoregolazione della propria espressione, dipende dall'abilità di *BCL6* di legare specifiche sequenze del DNA e reclutare complessi di deacetilazione degli istoni <sup>(21-23)</sup>. Ciò può avvenire direttamente o mediante l'interazione con multipli co-repressori <sup>(21-23)</sup>. In ultima analisi i programmi trascrizionali regolati da *BCL6* coinvolgono numerosi geni rilevanti nella promozione e nella modulazione della reazione centro germinativa <sup>(24, 25)</sup>. I geni regolati da *BCL6* determinano inibizione dell'arresto del ciclo cellulare e dell'apoptosi generando le condizioni ideali per lo sviluppo e il mantenimento del GC. Qui le cellule B sono meno su-



**Figura 1** - Rappresentazione schematica del centro germinativo (GC). Nella parte alta, da sinistra verso destra: (in verde) il linfocita B naïve incontra l'antigene e inizia la reazione centro germinativa; (in blu scuro) il linfocita B si organizza in follicolo primario e, nella zona scura del GC, va incontro a proliferazione clonale e ipermutazione somatica dei geni che codificano per la porzione variabile delle immunoglobuline; (in azzurro) il linfocita B entra nella zona chiara del GC, misura l'affinità per l'antigene interagendo con cellule follicolari dendritiche o linfociti T e va incontro a switch di classe isotipico. Qui subisce quattro possibili destini: i) differenziazione in linfocita B memoria (in rosso, parte alta), ii) differenziazione terminale in plasmacellula (in rosso, parte bassa), iii) selezione antigenica negativa e avvio del programma apoptotico, iv) ri-entro nella zona scura per un ulteriore ciclo di ipermutazione somatica e miglioramento dell'affinità per l'antigene. Nella parte bassa della figura: schema semplificato dei principali fattori di trascrizione attivi in fasi specifiche dell'iniziazione e del mantenimento del GC e della differenziazione terminale.

scettibili ai danni al DNA consentendone così il rimodellamento fisiologico. Altri geni inibiscono l'attivazione e la differenziazione dei linfociti B in modo da prevenire l'uscita prematura dal GC con Ig a bassa affinità per l'antigene <sup>(24, 25)</sup>.

Un gruppo di geni regolati da *BCL6* sono anche il target della metil-transferasi *EZH2*, ciò suggerisce che queste due proteine possano cooperare nella repressione trascrizionale <sup>(26)</sup>. L'espressione di *EZH2* in B cellule mature è limitata al GC ed è necessaria per il suo corretto sviluppo <sup>(27-29)</sup>. L'azione di *EZH2* è esercitata mediante silenziamento epigenetico e promuove la proliferazione linfocitaria prevenendo l'insuccesso di programmi differenziativi, entrambe caratteristiche essenziali del programma trascrizionale della DZ <sup>(26)</sup>.

I linfociti B della LZ, oltre ad interagire con l'antigene mediante Ig ad alta affinità, ricevono segnali addizionali da altri recettori: questi includono CD40, BAFF e *Toll-like receptors* (TLR) <sup>(1)</sup>. Queste interazioni attivano diverse vie di segnalazione cellulare e, tra le altre, convergono sull'attivazione del complesso trascrizionale NF-κB, il quale trans-attiva *IRF4*. *IRF4* a questo punto della reazione del GC reprime l'espressione di *BCL6* e favorisce la differenziazione post-GC <sup>(30)</sup>. L'importanza dell'asse NF-κB/*IRF4* nella fisiologia del GC è stata dimostrata sperimentalmente in diversi modelli murini; l'attivazione costitutiva di *NF-κB* produce un accumulo di plasmacellule, mentre la delezione di *IRF4* determina l'assenza della formazione di plasmacellule <sup>(31-33)</sup>. La produzione di plasmacellule richiede la rimodulazione del programma trascrizionale da programma del linfocita B che è mediato da fattori di trascrizione quali *PAX5* e *BCL6* a programma specifico plasmacellulare che è mediato, insieme al precedentemente descritto *IRF4*, da *PRMD1* e *XBPI* <sup>(34-37)</sup>. *IRF4*, oltre a reprimere l'espressione di *BCL6*, attiva *PRMD1* che a sua volta reprime l'espressione di *BCL6* e implementa il programma specifico plasmacellulare con il contributo di *XBPI* il quale determina il fenotipo anticorpo-secrente tipico delle plasmacellule <sup>(32, 37-40)</sup>.

Ad oggi, i meccanismi di differenziazione in linfocita B memoria rimangono largamente sconosciuti.

## Profilo di trascrizione genica e cellula di origine

Il DLBCL può essere suddiviso in due sottotipi principali in base al profilo di espressione genica: uno di questi esprime un insieme di geni che sono tipicamente espressi dalle cellule B del GC, il *germinal center B cell-like* (GCB) DLBCL <sup>(41-44)</sup>; il secondo gruppo esprime invece un insieme di geni che sono normalmente espressi a più alti livelli nelle cellule B attivate o plasmablasti, questo gruppo è stato dunque chiamato *activated B cell-like* (ABC) DLBCL <sup>(41-44)</sup>. Entrambi i sottotipi, GCB e ABC-DLBCL, sembrano essere più connessi alle cellule B della LZ.

Ciononostante il GCB-DLBCL è caratterizzato dall'elevata espressione di *BCL6* e *CD10*, dalla mancata espressione dei markers post-GC come *IRF4* e *PRMD1*, dalla presenza di geni delle Ig mutati con SHM in corso; al contrario ABC-DLBCL non presenta segni di SHM in corso, in accordo con un'origine da cellule al termine della permanenza nel GC e avviata verso la differenziazione plasmacellulare <sup>(5, 45, 46)</sup>. Il GCB-DLBCL è caratterizzato da una sopravvivenza superiore rispetto al più infuosto ABC-DLBCL in risposta al trattamento R-CHOP <sup>(44, 47)</sup>. Oltre a questi due sottotipi principali è stato descritto un altro tipo di DLBCL, il *primary mediastinal B cell lymphoma* (PMBL) che rappresenta un sottotipo distinto e identificabile mediante l'analisi del profilo trascrizionale. Il PMBL origina da cellule B post-GC di origine timica e a localizzazione mediastinica ed è riconosciuto come una identità separata e distinta di DLBCL dalla classificazione delle neoplasie linfoidi dell'Organizzazione Mondiale della Sanità <sup>(48, 49)</sup>.

## Profilo mutazionale

Nel GC l'attività proliferativa dei linfociti B è esasperata e i sistemi di controllo del danno al DNA, a seguito dell'azione di *BCL6*, sono silenziati. Come descritto precedentemente, SHM e CRS sono essenziali per la corretta maturazione della risposta immunitaria, ma per l'intrinseca natura di questi processi biologici, consentendo l'introduzione di rotture e mutazioni del DNA, espongono il genoma dei linfociti B del GC a un rischio costante <sup>(50, 51)</sup>.

Di conseguenza molte delle alterazioni strutturali implicate nella patogenesi del DLBCL come le traslocazioni cromosomali e l'ipermutazione somatica aberrante (ASHM) derivano da errori durante uno di questi due processi. Ciò è stato dimostrato formalmente in un modello murino in cui l'assenza di AID, l'enzima responsabile di entrambi SHM e CSR, previene lo sviluppo tumorale <sup>(52-54)</sup>.

L'ASHM è un meccanismo di instabilità genomica che colpisce le sequenze al 5' di geni attivamente trascritti ed è il risultato del malfunzionamento del processo fisiologico di SHM <sup>(55)</sup>. Nei linfociti B del GC normali, sebbene AID sia in grado di legare il DNA in molteplici *loci*, SHM interessa un numero limitato di geni (tra cui *BCL6* e i geni delle Ig), poiché i meccanismi di riparazione del danno al DNA intervengono con alta efficienza in caso di introduzione di mutazioni in altre regioni del genoma <sup>(56, 57)</sup>.

Circa il 50% dei DLBCL, al contrario, presenta un alto numero di mutazioni somatiche in molteplici geni attivamente trascritti (tra gli altri i proto-oncogeni *PIMI* e *MYC*) <sup>(55, 58)</sup>.

Analogamente ad altre neoplasie, il genoma del DLBCL è caratterizzato da delezioni, amplificazioni, e mutazioni puntiformi che risultano nell'attivazione di oncogeni o nell'inattivazione di geni oncosoppressori. Nel corso della scorsa decade, la rapida diffu-

sione e il diminuito costo delle tecniche di sequenziamento del genoma hanno permesso lo studio e l'analisi dei cambiamenti genetici e trascrizionali alla base di questa malattia<sup>(59-63)</sup>. Questo ha consentito la comprensione delle basi genetiche del DLBCL offrendo una visione comprensiva delle alterazioni dei geni e delle vie di segnalazione cellulare affette in questo linfoma, che potrebbero contribuire allo sviluppo ed all'espansione del tumore<sup>(59-63)</sup>. Al momento, sebbene non tutti i candidati siano stati caratterizzati funzionalmente, questi studi hanno fornito un notevole aiuto nella comprensione della patogenesi del DLBCL. Di particolare interesse è il fatto che questi abbiano messo in evidenza specifiche molecole e circuiti da cui il tumore dipende per la propria sopravvivenza e crescita, costituendo così un interessante target per lo sviluppo di nuovi farmaci. Il genoma del DLBCL è relativamente complesso e presenta, in media, dalle 50 a oltre 100 lesioni per caso ed è caratterizzato da una elevata variabilità tra i pazienti<sup>(59-63)</sup>.

### Alterazioni genetiche comuni a GCB e ABC

La complessità molecolare del DLBCL si può evincere dal profilo mutazionale: alcune lesioni genetiche sono comuni ai sottotipi, mentre altre risultano specifiche per GCB- o ABC-DLBCL (Figura 2). In tutti i DLBCL, il rimodellamento epigenomico rappresenta un programma frequentemente alterato. Circa il 30% dei casi di DLBCL presenta mutazioni inattivanti e/o delezioni di *CREBBP* e, meno frequentemente, *EP300*, due geni codificanti per acetiltransferasi che introducono gruppi acetile sui residui di lisina in proteine istoniche e nucleari non-istoniche, e così modulano l'attività di un ampio numero di fattori trascrizionali che legano il DNA<sup>(64,65)</sup>. Le mutazioni di *CREBBP* includono eventi troncati che risultano nella rimozione della porzione C-terminale la proteina caratterizzata dalla presenza del dominio HAT (responsabile della funzione acetilante) e sostituzioni aminoacidiche che alterano la capacità di legare l'acetil-coenzima A, così riducendo se-

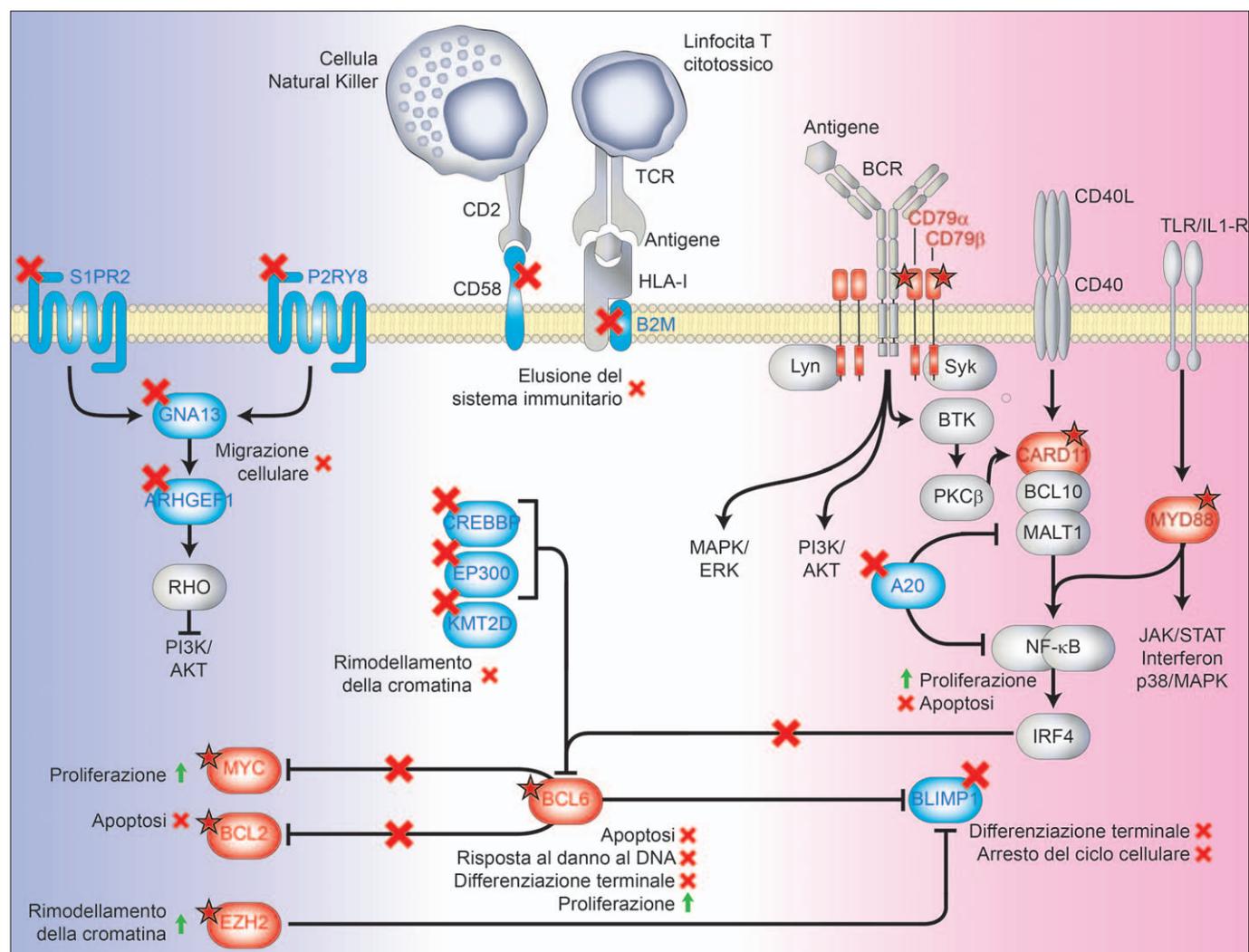


Figura 2 - Alterazioni genetiche di frequente riscontro nel linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL). Sono qui illustrate le principali vie di segnalazione colpite da lesioni genetiche nel DLBCL senza distinzione di sottotipo (al centro, sfondo bianco); a sinistra (sfondo blu) le alterazioni genetiche specifiche del GCB-DLBC e a destra (sfondo rosa) le lesioni genetiche che colpiscono l'ABC-DLBC. I geni affetti da lesioni sono schematizzati in rosso con una stella in caso di alterazioni attivanti, sono rappresentati in azzurro con una X in caso di alterazioni che impediscono la funzione della proteina.

veramente l'attività enzimatica. Una modalità in cui queste alterazioni contribuiscono alla linfomagenesi è mediante la menomata acetilazione dei substrati BCL6 e p53, la quale conduce all'attivazione dell'onco-proteina e alla diminuita funzione dell'oncosoppressore<sup>(65, 66)</sup>. Il delicato equilibrio tra l'attività di queste due proteine è essenziale per la regolazione della risposta al danno al DNA durante il rimodellamento immunoglobulinico nel GC normale. L'aumentata attività di BCL6 e la contemporanea diminuzione dell'attività di p53 conducono ad un'aumentata tolleranza al danno genomico e ad una ridotta risposta apoptotica<sup>(67)</sup>. CREBBP regola *enhancer* e *super-enhancer* di geni importanti coinvolti nella trasduzione del segnale del recettore delle cellule B (BCR) e di CD40, nel controllo trascrizionale del GC, nella produzione di plasmacellule e nella presentazione dell'antigene<sup>(68, 69)</sup>. La perdita di CREBBP contribuisce alla linfomagenesi consentendo la soppressione di *enhancer* regolati dal complesso BCL6/SMRT/HDAC3, suggerendo che l'inibizione di questo complesso potrebbe essere un interessante target terapeutico<sup>(68, 69)</sup>. Da notare è il fatto che la perdita di CREBBP nei linfociti B facilita lo sviluppo di linfomi derivati dal GC (DLBCL e linfoma follicolare [FL]) in modelli murini<sup>(68, 69)</sup>.

Un terzo dei DLBCL presenta mutazioni al gene *KMT2D*<sup>(61)</sup>. *KMT2D* codifica per una metil-transferasi che regola la trascrizione mediante la tri-metilazione della lisina alla posizione 4 dell'istone 3 (H3K4). La maggior parte delle alterazioni a carico di *KMT2D* causa la generazione di una proteina tronca, mancante del dominio catalitico SET necessario per l'attività di metil-transferasi. Tra i target trascrizionali di *KMT2D* vanno annoverati geni quali *TNFAIP3*, *SOCS3* e *TNFRSF14*, i quali sono a loro volta frequentemente mutati nel DLBCL<sup>(70, 71)</sup>. Come per CREBBP, anche per *KMT2D* la delezione del gene in modelli murini facilita lo sviluppo di linfomi derivati dal GC<sup>(70, 71)</sup>.

Le mutazioni inattivanti di CREBBP e *KMT2D* sono state descritte anche in casi di FL (40% e ~90%, le rispettive incidenze) costituendo i geni più frequentemente mutati in LNH<sup>(61, 62, 65)</sup>. Studi indirizzati alla ricostruzione della storia evolutiva della trasformazione da FL a DLBCL hanno determinato che le mutazioni ai danni di CREBBP e *KMT2D* sono eventi precoci che colpiscono il clone del precursore comune di queste due malattie prima dell'evoluzione divergente di FL e FL trasformato<sup>(72, 73)</sup>.

L'alterazione dell'attività di BCL6 rappresenta un meccanismo chiave della patogenesi del DLBCL e può essere ottenuta attraverso molteplici modalità. In circa il 30% dei pazienti affetti da DLBCL senza distinzione di sottotipo, ma con frequenza più elevata negli ABC-DLBCL, è possibile individuare riarrangiamenti cromosomici del locus di *BCL6*<sup>(74, 75)</sup>. Si tratta di traslocazioni cromosomiche reciproche e bilanciate che giustappongono la porzione codificante del gene di *BCL6* al 3' di promotori eterologi

derivati da molteplici partner di traslocazione<sup>(74, 75)</sup>. Queste traslocazioni hanno come conseguenza l'espressione della proteina BCL6, intatta e funzionale al di fuori di un contesto fisiologico. *BCL6*, come ricordato nel paragrafo precedente, è un target fisiologico dell'attività enzimatica di AID nel GC<sup>(55, 57)</sup>. Sebbene AID induca multiple mutazioni puntiformi come risultato della fisiologica SHM, un gruppo di queste mutazioni squisitamente presente nel DLBCL è localizzato nella porzione non codificante dell'esone 1 di *BCL6*<sup>(55, 57)</sup>. Queste mutazioni colpiscono il dominio autoregolatorio tramite cui la proteina BCL6 controlla la propria trascrizione e prevengono il legame di IRF4 impedendo così la repressione della trascrizione esercitata da quest'ultimo a seguito della stimolazione del recettore CD40<sup>(22, 30, 76)</sup>. In aggiunta alle lesioni genetiche che colpiscono direttamente il gene *BCL6*, il DLBCL usufruisce di molteplici meccanismi di attivazione indiretta. Oltre alle già citate mutazioni di CREBBP/EP300 che danneggiano l'inattivazione di BCL6 mediata dall'acetilazione, circa il 10% dei DLBCL presenta mutazioni attivanti del fattore di trascrizione MEF2B, una proteina espressa ad alti livelli nel GC e coinvolta nell'attivazione trascrizionale di *BCL6*<sup>(18, 61)</sup>. Queste lesioni amplificano l'attività di MEF2B principalmente mediante 2 meccanismi: aumento dell'attività trascrizionale dovuta a mutazioni nella porzione N-terminale della proteina o mediante la perdita dei motivi regolatori nella porzione C-terminale<sup>(18)</sup>.

Un ampio numero di DLBCL ha sviluppato meccanismi per evadere la sorveglianza del sistema immunitario mediato dai linfociti T e/o mediato dalle cellule *natural killer*. Circa un quarto dei DLBCL presenta mutazioni inattivanti o delezioni al gene *B2M* che codifica per la beta-2-microglobulina, mentre circa un altro quarto di questi linfomi non esprime la proteina in assenza di alterazioni genetiche, suggerendo la possibilità di ulteriori meccanismi di inattivazione<sup>(77)</sup>. La beta-2-microglobulina costituisce insieme alle catene pesanti HLA il complesso maggiore di immunocompatibilità di classe I: questo complesso proteico espresso ubiquitariamente su tutte le cellule nucleate è necessario per il riconoscimento da parte dei linfociti T<sup>(78)</sup>.

Mutazioni e delezioni di *TP53* rappresentano un ulteriore meccanismo patogenetico che coinvolge circa il 20% dei DLBCL, inclusi quelli derivati da una trasformazione aggressiva di un precedente linfoma indolente<sup>(62, 73, 79-81)</sup>.

### Alterazioni genetiche del GCB

Fino a qualche anno fa, prima degli studi volti a definire la genomica del DLBCL, non erano molte le lesioni genetiche scoperte che si potessero associare preferenzialmente con il sottotipo GCB-DLBCL. Queste includono traslocazioni cromosomiche di *BCL2* (~40% dei casi) e di *MYC* (~10% dei casi); entrambe causano l'espressione ectopica della proteina coinvolta evitando la repressione trascrizionale BCL6-mediata<sup>(10, 82)</sup>. Meno frequentemente

si possono individuare delezioni del gene oncosoppressore *PTEN* o amplificazioni del cluster di microRNA 17-92 che controlla negativamente l'espressione di di *PTEN* (-10% dei casi) <sup>(43)</sup>.

Più recentemente sono state individuate mutazioni somatiche a carico di *EZH2* in circa il 22% dei pazienti affetti da GCB-DLBCL <sup>(83)</sup>. Come descritto in precedenza, *EZH2* è una metil-transferasi che nel GC, mediante silenziamento epigenetico, promuove la proliferazione dei linfociti B e previene l'innescamento di programmi differenziali <sup>(26)</sup>. Le mutazioni a carico di questo gene consistono nella sostituzione di un residuo aminoacidico altamente conservato nella filogenesi (tirosina 641) che si trova nel dominio catalitico SET della proteina e che causano un'augmentata attività enzimatica con conseguente aumento dei livelli di tri-metilazione della lisina 27 dell'istone 3 <sup>(83,84)</sup>. In modelli murini, l'espressione condizionale di *EZH2* mutato induce iperplasia dei GC e, se associata all'espressione ectopica di *BCL2*, induce accelerata linfomagenesi <sup>(27)</sup>.

Circa il 30% dei GCB-DLBCL è caratterizzato da mutazioni inattivanti che colpiscono i componenti di un circuito inibitorio accoppiato a proteine-G che regola la crescita, la localizzazione e il confinamento dei linfociti B del GC (*GNA13*, *SIRP2* e, meno frequentemente, *ARHGEF1* e *P2RY8*) <sup>(85)</sup>. La perdita di questi geni in un modello murino è associata con la diminuzione della sopravvivenza delle cellule B del GC e la disseminazione delle stesse ai linfonodi e al midollo osseo conducendo, in ultima analisi, alla linfomagenesi <sup>(85)</sup>.

### Alterazioni genetiche dell'ABC

La genomica del sottotipo ABC-DLBCL è meglio caratterizzata ed è associata con una serie di lesioni genetiche che convergono su due vie di segnalazione principali: attivazione di NF-κB e blocco della differenziazione terminale delle cellule B.

I linfomi ABC-DLBCL presentano attivazione cronica del BCR e della via di segnalazione ad esso associata <sup>(86)</sup>. Questa richiede la presenza di CARD11 ed è mantenuta dalle frequenti mutazioni dei geni codificanti per le proteine dei membri prossimali del *pathway* <sup>(86)</sup>. Più del 20% dei pazienti presenta mutazioni somatiche ai geni *CD79A/B* che codificano per co-recettori di membrana membri della superfamiglia delle Ig <sup>(86)</sup>. La mutazione più frequente di questi recettori coinvolge la tirosina alla posizione 196 nel dominio citoplasmatico dell'immunorecettore. Queste mutazioni impediscono la fosforilazione di questo residuo e così prevengono la soppressione della via di segnalazione del BCR che resta cronicamente attiva <sup>(86)</sup>.

L'ABC-DLBCL presenta attivazione della via di segnalazione del BCR e di NF-κB anche mediante mutazioni attivanti del gene *CARD11*. *CARD11* è uno dei componenti del complesso segnalosoma e, come detto in precedenza, il proprio reclutamento è necessario per una corretta trasduzione del segnale del BCR <sup>(87)</sup>. Queste mutazioni si localizzano prevalentemente negli esoni che

codificano per i domini *coiled-coil* della proteina e incrementano la capacità di CARD11 di transattivare i geni target di NF-κB <sup>(88)</sup>. Mutazioni somatiche attivanti ai danni di *MYD88* sono state identificate in un terzo degli ABC-DLBCL. Colpiscono il residuo aminoacidico di leucina alla posizione 265, un residuo filogeneticamente molto conservato del dominio TIR (Toll/IL1 receptor), sostituendolo con una prolina <sup>(89)</sup>. Questa sostituzione aminoacidica comporta in ultima analisi l'attivazione delle risposte trascrizionali legate a NF-κB e a JAK/STAT3 attivando programmi di proliferazione e sopravvivenza cellulare <sup>(89)</sup>.

Circa un terzo degli ABC-DLBCL è caratterizzato da mutazioni inattivanti e/o delezioni che colpiscono entrambi gli alleli del gene *TNFAIP3* <sup>(90,91)</sup>. Questo gene codifica per l'enzima A20 la cui funzione fisiologica è quella di terminare la risposta di trascrizione genica di NF-κB scatenata dalla stimolazione del BCR. A20 adempie a questo ruolo modificando lo stato di ubiquitinazione di diversi substrati coinvolti nella via di segnalazione di NF-κB. Di conseguenza, le lesioni inattivanti ai danni di *TNFAIP3* determinano una non-fisiologica e prolungata risposta di NF-κB <sup>(90,91)</sup>.

Come dettagliato nel paragrafo dedicato al GC, la differenziazione terminale in plasmacellule dei linfociti B che hanno maturato affinità per l'antigene nel GC richiede l'attività di PRMD1, un repressore trascrizionale che viene espresso in alcune B cellule della LZ che sono indirizzate alla differenziazione in plasmacellula <sup>(40)</sup>. Circa un quarto degli ABC-DLBCL perde l'abilità di esprimere PRMD1 a causa di mutazioni troncanti, mutazioni puntiformi che causano sostituzioni aminoacidiche e/o delezioni del suo *locus* genico <sup>(92-94)</sup>. Un'altra frazione degli ABC-DLBCL perde l'abilità di esprimere PRMD1 a causa dell'azione di repressione trascrizionale da parte dell'espressione oncogenica di *BCL6* dovuta a traslocazioni che coinvolgono questo gene <sup>(92)</sup>. I riarrangiamenti cromosomici che coinvolgono *BCL6* e le lesioni inattivanti ai danni di *PRMD1* sono, nei pazienti affetti da ABC-DLBCL, mutualmente esclusive a conferma del ruolo complementare che queste alterazioni hanno nella linfomagenesi e in particolare nel blocco della differenziazione terminale in plasmacellule.

### Implicazioni terapeutiche

I progressi fatti nella comprensione della patogenesi del DLBCL hanno implicazioni dirette nel trattamento di questa malattia. Le terapie attualmente disponibili per questo linfoma sono basate su regimi terapeutici altamente tossici e non specifici come chemioterapici, terapie radianti e l'utilizzo dell'anticorpo anti-CD20 rituximab <sup>(95)</sup>. Le recenti scoperte circa la genetica e le caratteristiche molecolari del DLBCL e dei suoi sottotipi fornisce un'importante fonte di informazioni per lo sviluppo di nuovi farmaci più efficaci e meno tossici. Infatti, nuove molecole dirette contro queste lesioni sono già disponibili o attualmente in fase di speri-

mentazione clinica<sup>(96)</sup>. Inibitori di BCL2 e EZH2 sono già disponibili e potrebbero essere utilizzati nella terapia del GCB-DLBCL<sup>(27, 97-99)</sup>. Gli inibitori del complesso di deacetilazione degli istoni potrebbero essere utilizzati nei casi di DLBCL che presentano difetti alle acetil-transferasi, mentre gli inibitori di NF- $\kappa$ B o della via di segnalazione del BCR (come ad esempio ibrutinib)

potrebbero essere efficaci negli ABC-DLBCL dal momento che si sono dimostrati attivi contro altre neoplasie linfoidi<sup>(96)</sup>.

Soltanto il continuo miglioramento della comprensione dei meccanismi molecolari che stanno alla base della patogenesi del DLBCL consentirà la corretta stratificazione e la corretta scelta del regime terapeutico ottimale per il singolo paziente.

## Bibliografia

1. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:429-57.
2. Berek C, Berger A, Apel M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*. 1991;67(6):1121-9.
3. Jacob J, Kelsoe G, Rajewsky K, Weiss U. Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature*. 1991;354(6352):389-92.
4. Victora GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, et al. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell*. 2010;143(4):592-605.
5. Victora GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R, Nussenzweig MC. Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas. *Blood*. 2012;120(11):2240-8.
6. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, et al. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol*. 2004;5(9):943-52.
7. Allen CD, Okada T, Tang HL, Cyster JG. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science*. 2007;315(5811):528-31.
8. Schwickert TA, Lindquist RL, Shakhar G, Livshits G, Skokos D, Kosco-Vilbois MH, et al. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature*. 2007;446(7131):83-7.
9. Zhang Y, Garcia-Ibanez L, Toellner KM. Regulation of germinal center B-cell differentiation. *Immunol Rev*. 2016;270(1):8-19.
10. Dominguez-Sola D, Victora GD, Ying CY, Phan RT, Saito M, Nussenzweig MC, et al. The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat Immunol*. 2012;13(11):1083-91.
11. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Keller JL, Haddad J, Jr., Miljkovic V, et al. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(5):2639-44.
12. Dominguez-Sola D, Gautier J. MYC and the control of DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(6):1-20.
13. Lin CY, Loven J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, et al. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell*. 2012;151(1):56-67.
14. Dominguez-Sola D, Dalla-Favera R. PINning down the c-Myc oncoprotein. *Nat Cell Biol*. 2004;6(4):288-9.
15. Calado DP, Sasaki Y, Godinho SA, Pellerin A, Kochert K, Sleckman BP, et al. The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat Immunol*. 2012;13(11):1092-100.
16. Lee CH, Melchers M, Wang H, Torrey TA, Slota R, Qi CF, et al. Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. *J Exp Med*. 2006;203(1):63-72.
17. Ochiai K, Maienschein-Cline M, Simonetti G, Chen J, Rosenthal R, Brink R, et al. Transcriptional regulation of germinal center B and plasma cell fates by dynamical control of IRF4. *Immunity*. 2013;38(5):918-29.
18. Ying CY, Dominguez-Sola D, Fabi M, Lorenz IC, Hussein S, Bansal M, et al. MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Immunol*. 2013;14(10):1084-92.
19. Willis SN, Good-Jacobson KL, Curtis J, Light A, Tellier J, Shi W, et al. Transcription factor IRF4 regulates germinal center cell formation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Immunol*. 2014;192(7):3200-6.
20. Basso K, Dalla-Favera R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev*. 2012;247(1):172-83.
21. Hatzi K, Melnick A. Breaking bad in the germinal center: how deregulation of BCL6 contributes to lymphomagenesis. *Trends Mol Med*. 2014;20(6):343-52.
22. Pasqualucci L, Migliazza A, Basso K, Houldsworth J, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Mutations of the BCL6 proto-oncogene disrupt its negative autoregulation in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101(8):2914-23.
23. Huang C, Hatzi K, Melnick A. Lineage-specific functions of Bcl-6 in immunity and inflammation are mediated by distinct biochemical mechanisms. *Nat Immunol*. 2013;14(4):380-8.
24. Basso K, Saito M, Sumazin P, Margolin AA, Wang K, Lim WK, et al. Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood*. 2010;115(5):975-84.
25. Ci W, Polo JM, Cerchietti L, Shaknovich R, Wang L, Yang SN, et al. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood*. 2009;113(22):5536-48.
26. Velichutina I, Shaknovich R, Geng H, Johnson NA, Gascoyne RD, Melnick AM, et al. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood*. 2010;116(24):5247-55.
27. Beguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell*. 2013;23(5):677-92.
28. Caganova M, Carrisi C, Varano G, Mainoldi F, Zanardi F, Germain PL, et al. Germinal center dysregulation by histone methyltransferase EZH2 promotes lymphomagenesis. *J Clinical Invest*. 2013;123(12):5009-22.
29. Su IH, Basavaraj A, Krutchinsky AN, Hobert O, Ullrich A, Chait BT, et al. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol*. 2003;4(2):124-31.
30. Saito M, Gao J, Basso K, Kitagawa Y, Smith PM, Bhagat G, et al. A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2007;12(3):280-92.
31. Chu Y, Vahl JC, Kumar D, Heger K, Bertossi A, Wojtowicz E, et al. B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood*. 2011;117(7):2227-36.
32. Sciammas R, Shaffer AL, Schatz JH, Zhao H, Staudt LM, Singh H. Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity*. 2006;25(2):225-36.
33. Klein U, Casola S, Cattoretti G, Shen Q, Lia M, Mo T, et al. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol*. 2006;7(7):773-82.
34. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol*. 2007;8(5):463-70.
35. Nera KP, Kohonen P, Narvi E, Peippo A, Mustonen L, Terho P, et al. Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity*. 2006;24(3):283-93.
36. Nutt SL, Taubenheim N, Hasbold J, Corcoran LM, Hodgkin PD. The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Semin Immunol*. 2011;23(5):341-9.

37. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*. 2001;412(6844):300-7.
38. Hu CC, Dougan SK, McGehee AM, Love JC, Ploegh HL. XBP-1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B cells. *EMBO Journal*. 2009;28(11):1624-36.
39. Kallies A, Hasbold J, Fairfax K, Pridans C, Emslie D, McKenzie BS, et al. Initiation of plasma-cell differentiation is independent of the transcription factor Blimp-1. *Immunity*. 2007;26(5):555-66.
40. Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity*. 2003;19(4):607-20.
41. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
42. Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005;106(9):3183-90.
43. Lenz G, Wright GW, Emre NC, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(36):13520-5.
44. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346(25):1937-47.
45. Lenz G, Nagel I, Siebert R, Roschke AV, Sanger W, Wright GW, et al. Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med*. 2007;204(3):633-43.
46. Lossos IS, Alizadeh AA, Eisen MB, Chan WC, Brown PO, Botstein D, et al. Ongoing immunoglobulin somatic mutation in germinal center B cell-like but not in activated B cell-like diffuse large cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(18):10209-13.
47. Hans CB, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-82.
48. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011;117(19):5019-32.
49. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003;198(6):851-62.
50. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000;102(5):553-63.
51. Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, et al. Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) Deficiency Causes the Autosomal Recessive Form of the Hyper-IgM Syndrome (HIGM2). *Cell*. 2000;102(5):565-75.
52. Küppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 2001; 20(40):5580-94.
53. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, Compagno M, Smith P, Muramatsu M, et al. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet*. 2008;40(1):108-12.
54. Ramiro AR, Jankovic M, Eisenreich T, Difilippantonio S, Chen-Kiang S, Muramatsu M, et al. AID Is Required for c-myc/IgH Chromosome Translocations In Vivo. *Cell*. 2004;118(4):431-8.
55. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RSK, Küppers R, et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 2001;412(6844):341-6.
56. Liu M, Duke JL, Richter DJ, Vinuesa CG, Goodnow CC, Kleinstein SH, et al. Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature*. 2008;451(7180):841-5.
57. Yamane A, Resch W, Kuo N, Kuchen S, Li Z, Sun H-w, et al. Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nat Immunol*. 2010;12(1):62-9.
58. Khodabakhshi AH, Morin RD, Fejes AP, Mungall AJ, Mungall KL, Bolger-Munro M, et al. Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma. *Oncotarget*. 2012;3(11):1308-19.
59. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-18.
60. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(10):3879-84.
61. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011;476(7360):298-303.
62. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43(9):830-7.
63. Reddy A, Zhang J, Davis NS, Moffitt AB, Love CL, Waldrop A, et al. Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell*. 2017;171(2):481-94.e15.
64. Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev*. 2000;14(13):1553-77.
65. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. *Nature*. 2011;471(7337):189-95.
66. Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Gen*. 2002;32(4):606-13.
67. Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*. 2004;432(7017):635-9.
68. Jiang Y, Ortega-Molina A, Geng H, Ying HY, Hatzi K, Parsa S, et al. CREBBP Inactivation Promotes the Development of HDAC3-Dependent Lymphomas. *Cancer Discov*. 2017;7(1):38-53.
69. Zhang J, Vlasevska S, Wells VA, Nataraj S, Holmes AB, Duval R, et al. The CREBBP Acetyltransferase Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor in B-cell Lymphoma. *Cancer Discov*. 2017;7(3):322-37.
70. Ortega-Molina A, Boss IW, Canela A, Pan H, Jiang Y, Zhao C, et al. The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. *Nat Med*. 2015;21(10):1199-208.
71. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, Lee JE, Holmes AB, Bansal M, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat Med*. 2015;21(10):1190-8.
72. Green MR, Gentles AJ, Nair RV, Irish JM, Kihira S, Liu CL, et al. Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma. *Blood*. 2013;121(9):1604-11.
73. Pasqualucci L, Khiabani H, Fangazio M, Vasishta M, Messina M, Holmes Antony B, et al. Genetics of Follicular Lymphoma Transformation. *Cell Rep*. 2014;6(1):130-40.
74. Iqbal J, Greiner TC, Patel K, Dave BJ, Smith L, Ji J, et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2007;21(11):2332-43.
75. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, et al. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science*. 1993;262(5134):747-50.
76. Wang X, Li Z, Naganuma A, Ye BH. Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(23):15018-23.
77. Challa-Malladi M, Lieu Yen K, Califano O, Holmes AB, Bhagat G, Murty Vundavalli V, et al. Combined Genetic Inactivation of  $\beta$ 2-Microglobulin and CD58 Reveals Frequent Escape from Immune Recognition in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell*. 2011;20(6):728-40.
78. Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev*. 2005;207:145-57.

79. Fabbri G, Khiabani H, Holmes AB, Wang J, Messina M, Mullighan CG, et al. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J Exp Med.* 2013;210(11):2273-88.
80. Fangazio M, De Paoli L, Rossi D, Gaidano G. Predictive markers and driving factors behind Richter syndrome development. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011;11(3):433-42.
81. Monti S, Chapuy B, Takeyama K, Rodig Scott J, Hao Y, Yeda Kelly T, et al. Integrative Analysis Reveals an Outcome-Associated and Targetable Pattern of p53 and Cell Cycle Deregulation in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer cell.* 2012;22(3):359-72.
82. Saito M, Novak U, Piovan E, Basso K, Sumazin P, Schneider C, et al. BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(27):11294-9.
83. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet.* 2010;42(2):181-5.
84. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SWG, Moradian A, et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood.* 2011;117(8):2451-9.
85. Muppidi JR, Schmitz R, Green JA, Xiao W, Larsen AB, Braun SE, et al. Loss of signalling via Galphai3 in germinal centre B-cell-derived lymphoma. *Nature.* 2014;516(7530):254-8.
86. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young RM, Romesser PB, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 2010;463(7277):88-92.
87. Thome M. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(5):348-59.
88. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, Lam L, George TC, Wright GW, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science.* 2008;319(5870):1676-9.
89. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 2011;470(7332):115-9.
90. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of N-kappa B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature.* 2009;459(7247):717-21.
91. Kato M, Sanada M, Kato I, Sato Y, Takita J, Takeuchi K, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature.* 2009;459(7247):712-6.
92. Mandelbaum J, Bhagat G, Tang H, Mo T, Brahmachary M, Shen Q, et al. BLIMP1 Is a Tumor Suppressor Gene Frequently Disrupted in Activated B Cell-like Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell.* 2010;18(6):568-79.
93. Pasqualucci L, Compagno M, Houlsdworth J, Monti S, Grunn A, Nandula SV, et al. Inactivation of the PRDM1/BLIMP1 gene in diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Med.* 2006;203(2):311-7.
94. Tam W, Gomez M, Chadburn A, Lee JW, Chan WC, Knowles DM. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2006;107(10):4090-100.
95. Abramson JS, Shipp MA. Advances in the biology and therapy of diffuse large B-cell lymphoma: moving toward a molecularly targeted approach. *Blood.* 2005;106(4):1164-74.
96. Shaffer AL 3rd, Young RM, Staudt LM. Pathogenesis of human B cell lymphomas. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:565-610.
97. Anderson MA, Huang D, Roberts A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Hematol.* 2014;51(3):219-27.
98. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature.* 2012;492(7427):108-12.
99. Qi W, Chan H, Teng L, Li L, Chuai S, Zhang R, et al. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(52):21360-5.



*Linfografia: localizzazione retroperitoneale di DLBCL  
(Archivio di G. Lambertenghi Delilieri)*

### Parole Chiave

Linfoma diffuso a grandi cellule B, centro germinativo, patogenesi molecolare, lesioni genetiche

### Indirizzi per la corrispondenza

*Riccardo Dalla-Favera*  
Institute for Cancer Genetics and the  
Herbert Irving Comprehensive Cancer Center,  
Columbia University, New York, NY 10032.  
E-mail: rd10@columbia.edu



# Quadro clinico



Roberta Sciarra, Luca Arcaini

Divisione di Ematologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo & Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Italia

## Introduzione

Il linfoma B diffuso a grandi cellule (DLBCL) è la neoplasia linfoide più frequente dell'età adulta e rappresenta circa il 30% dei casi di linfoma non Hodgkin (LNH) nei paesi occidentali, con un'incidenza annuale stimata di 15-20 casi ogni 100.000 abitanti. <sup>(1,2)</sup> L'età mediana alla diagnosi ad eccezione di alcuni sottotipi è di 60 anni e l'incidenza aumenta con l'età. <sup>(3)</sup> Il DLBCL riconosce forme primitive e forme secondarie che rappresentano l'evoluzione di un progresso LNH indolente o di un linfoma di Hodgkin a predominanza linfocitaria nodulare. Per quanto riguarda l'eziologia, si riconoscono quali fattori di rischio gli stati di immunodeficienza congenita (ataxia teleangectasia, sindrome di Wiskott-Aldrich, sindrome di Bloom, sindrome di Russel, sindrome di Chediak-Higashi, carenza congenita di IgA, immunodeficienza comune variabile, agammaglobulinemia) e acquisita (immunodepressione secondaria a trapianti di organo, infezione da virus HIV). Inoltre è da segnalare la frequente associazione di DLBCL con disordini autoimmuni, infezione da HCV <sup>(4)</sup> ed Epstein-Barr Virus (EBV) ed esposizione ad agenti ambientali quali fertilizzanti, pesticidi e radiazioni. <sup>(5)</sup>

## Presentazione clinica

Il DLBCL si presenta tipicamente come una tumefazione neoplastica a rapido accrescimento che può coinvolgere sedi nodali o extranodali e può insorgere praticamente in ogni sede; sono considerati tessuti nodali i linfonodi, la milza e il tessuto linfatico dell'anello del Waldeyer (tonsille, base della lingua, palato molle, nasofaringe). Le sedi extranodali di localizzazione iniziale più comuni sono il tratto gastroenterico, la cute e i tessuti molli; seguono le localizzazioni scheletriche, al tratto respiratorio, al tratto genitourinario, a fegato e pancreas, alla tiroide, alla mammella, all'encefalo e alle ghiandole salivari. <sup>(6)</sup>

Il quadro clinico all'esordio è estremamente variabile: circa un terzo dei pazienti si presenta con sintomi sistemici: febbre o febbre ricorrente,

prevalentemente serotina; calo ponderale pari o superiore al 10% del peso corporeo nei 6 mesi precedenti la diagnosi, e non altrimenti spiegato; sudorazioni notturne profuse. Oltre ai sintomi sistemici, vi sono i sintomi legati alla struttura anatomica interessata o alla possibile compressione vascolare da parte delle tumefazioni linfonodali. All'esordio solo il 20-30% dei pazienti presenta una malattia in stadio iniziale, mentre la restante parte esordisce in stadio avanzato con coinvolgimento di sedi extranodali nel 40% dei casi; il 15% dei pazienti con DLBCL presenta all'esordio un interessamento osteomidollare che può essere di due tipi: *concordant* (interessamento da DLBCL) o *discordant* (interessamento da linfoma a basso grado), quest'ultimo a prognosi più favorevole. <sup>(7)</sup>

Il paziente può presentare adenopatie superficiali o profonde, con linfonodi che possono assumere un volume cospicuo e formare pacchetti linfonodali adesi ai piani superficiali e profondi. L'anello del Waldeyer è frequentemente coinvolto. La localizzazione gastrica è la più frequente del tratto gastroenterico (circa il 20% di tutti i linfomi extranodali); meno frequente è la localizzazione all'intestino tenue; queste possono accompagnarsi a dolori addominali, difficoltà digestive, disturbi dell'alvo, meteorismo; comune è la localizzazione epatica. Le localizzazioni cutanee si presentano sotto forma di noduli duri, intracutanei, incolori o con un colorito tipico rosso-blauastro. Le localizzazioni al sistema osseo possono determinare dolore localizzato alla pressione e fratture patologiche. Se vi è interessamento mediastinico, possono comparire segni o sintomi legati alla compressione o all'infiltrazione delle strutture adiacenti. L'interessamento delle sierose può associarsi a versamento essudativo o chiloso.

## Diagnosi istologica

La diagnosi di DLBCL deve essere formulata da un emolinfopatologo esperto su sezioni istologiche di materiale ottenuto mediante biopsia. Il campione biotipico viene inviato al laboratorio di anatomia patologica per indagini di immunohistochimica, di citometria a

flusso e di genetica molecolare. La biopsia incisionale o escissionale è il *gold standard* per fornire adeguato materiale istologico. L'ago-biopsia con ago tranciante eco o TAC guidata può essere effettuata quando non è possibile un approccio chirurgico o endoscopico o per accertare una progressione o una recidiva di malattia in pazienti con pregressa diagnosi di DLBCL. L'aspirazione con ago sottile (*fine needle*) fornisce unicamente uno striscio citologico e non è adeguata, da sola, per la diagnosi iniziale dei pazienti con DLBCL. <sup>(8)</sup>

## Stadiazione clinica

La valutazione clinica iniziale prevede un'anamnesi accurata con ricerca dei sintomi sistemici (febbre, sudorazioni notturne profuse, calo ponderale superiore al 10% del peso corporeo negli ultimi 6 mesi non altrimenti spiegabile) e di sintomi connessi ad eventuali localizzazioni extranodali di malattia. Fondamentale, a fini prognostici e terapeutici, la definizione del *performance status* del paziente secondo ECOG (Tabella 1).

GRADO	ECOG
0	Completamente attivo, esegue tutte le attività precedenti alla malattia senza limitazioni
1	Limitato nelle attività fisicamente ardue ma in grado di eseguire lavori leggeri o sedentari
2	Capace di provvedere completamente a se stesso ma non capace di eseguire attività lavorative di qualsiasi grado; in piedi per più del 50% delle ore di veglia
3	Capace di provvedere a se stesso limitatamente, confinato a letto o in poltrona per più del 50% delle ore di veglia
4	Completamente inabile. Non in grado di provvedere a se stesso. Completamente confinato a letto o in poltrona
5	Decesso

Tabella 1 - Performance Status dell'Eastern Cooperative Oncology Group/World Health Organization (ECOG)

MISURA	FIT	UNFIT	FRAIL
ADL	6	5	≤
IADL	8	7-6	≤
CIRS	0 score = 3-4 <5 score = 2	0 score = 3-4 1 score = 2	1 score = 3-4 >8 score = 2
ETÀ		≥80 FIT	≥ UNFIT

Tabella 2 - Criteri per la valutazione geriatrica dimensionale

L'esame obiettivo deve includere la ricerca di tumefazioni palpabili a livello delle stazioni linfonodali superficiali, l'ispezione delle strutture dell'anello del Waldeyer, la ricerca di organomegalie e di masse palpabili, una valutazione accurata della cute, oltre alla routinaria valutazione dell'obiettività cardio-toraco-addominale.

All'esordio le seguenti indagini sono obbligatorie: esame emocromocitometrico completo; esami ematochimici di funzionalità epatica e renale; elettroforesi sieroproteine; dosaggio della latticodeidrogenasi sierica (LDH), che rappresenta un indicatore dell'attività tumorale e un parametro prognostico; dosaggio dei livelli di acido urico, per identificare i pazienti a maggior rischio di nefropatia da urati; sierologie virali complete per HIV, HCV e HBV (HBs antigene, anticorpi anti-HBs e anti-HBc) per il possibile ruolo di questi agenti virali nel processo di linfomagenesi e per i risvolti terapeutici (profilassi o terapia antivirale nei casi di infezione attiva da HCV o HBV). I pazienti giovani in età fertile devono essere edotti rispetto ai rischi di infertilità e teratogenicità connessi alla chemioterapia. Il paziente dovrebbe essere riferito a un Centro di procreazione medicalmente assistita ove siano proposte metodiche di preservazione della fertilità (criopreservazione del liquido seminale, criopreservazione di ovociti/tessuto ovarico).

Nei pazienti di età superiore a 65 anni bisogna eseguire una valutazione geriatrica per definire lo stato di fragilità del paziente. Il modello di valutazione geriatrica multidimensionale utilizza le scale ADL (valutazione delle attività di base della vita quotidiana), IADL (valutazione delle attività strumentali della vita quotidiana) e CIRS (valutazione dell'indice di comorbilità) (Tabella 2) <sup>(9)</sup>.

Nei pazienti candidati a trattamento potenzialmente cardi tossico, come nel caso di impiego di antracicline, è fondamentale lo studio della funzionalità cardiaca mediante elettrocardiogramma ed ecocardiogramma.

## Esami strumentali

Secondo le ultime linee guida proposte dalla classificazione di Lugano, la PET/TAC rappresenta il *gold standard* per la stadiazione e la valutazione della risposta alla terapia dei pazienti con DLBCL.

L'esame PET/TAC definisce un coinvolgimento linfonodale in presenza di un'umentata ipercaptazione; il coinvolgimento splenico ed epatico può essere sospettato in presenza di un'ipercaptazione diffusa, nodulare (singola massa o plurimi noduli) o miliare. L'esame è inoltre adeguato per riconoscere il coinvolgimento di sedi extranodali <sup>(10, 11)</sup>. La TAC non è più strettamente necessaria nel processo di stadiazione del linfoma; essa però consente una migliore visualizzazione delle linfadenopatie a livello del distretto intestinale, identifica compressioni e trombosi a carico di vasi centrali o mediastinici fondamentali per avviare opportuna terapia anticoagulante, permette una misurazione più accurata di masse patologiche e linfonodi (utile nel *setting* di un trial clinico). Inoltre, la TAC viene utilizzata nella pianificazione del trattamento radioterapico.

La PET/TAC mostra, rispetto all'esame biptico, una maggiore specificità e sensibilità nell'individuare un coinvolgimento midollare da linfoma, <sup>(12, 13)</sup> fanno eccezione i casi in cui l'infiltrato linfomatoso costituisca meno del 10-20% della cellularità midollare totale o sia rappresentato da un linfoma a basso grado di malignità. In tali casi la PET può risultare falsamente negativa e tale coinvolgimento può essere invece evidenziato dalla biopsia osteomidollare (evenienza che si verifica solo nel 10% dei casi).<sup>(14)</sup> Pertanto, allo stato attuale, l'esame PET viene considerato sufficiente per identificare o escludere un coinvolgimento midollare.

La biopsia osteomidollare è indicata solo nel caso di pazienti con PET negativa, suggestiva per uno stadio iniziale, in cui si sospetti la presenza di un infiltrato linfomatoso a basso grado (i.e., *discordant lymphoma*) e in cui un risultato positivo determinerebbe una modifica della stadiazione del linfoma con variazione di prognosi e trattamento. Solo in alcuni casi selezionati, è raccomandata l'esecuzione di ulteriori esami strumentali (in aggiunta alla PET):

- risonanza magnetica nucleare, per lo studio dei linfomi cerebrali;
- rachicentesi con esame chimico fisico e immunocitofluorimetrico del liquido spinale per pazienti ad elevato rischio di localizzazione al sistema nervoso centrale;<sup>(15)</sup>
- ecografia dei testicoli, nei pazienti con linfoma primitivo dell'encefalo o primitivo del testicolo.

La stadiazione del DLBCL si basa sulla revisione di Lugano del sistema di classificazione di Ann Arbor/Cotswolds, che definisce quattro stadi di malattia in base al numero delle localizzazioni e alle sedi anatomiche interessate dal linfoma. (Tabella 3)

Di seguito le modifiche proposte nel 2014 dalla Classificazione di Lugano per la stadiazione del DLBCL<sup>(10)</sup>:

- Tonsille, anello del Waldeyer e milza sono attualmente considerati tessuti nodali.
- La designazione "E" per indicare la presenza di malattia extranodale è da riservare ai pazienti con singola localizzazione extranodale in

assenza di localizzazioni nodali (IE) o in pazienti in stadio limitato con coinvolgimento di una sede extranodale per contiguità; pertanto, nei pazienti in stadio avanzato di malattia la designazione "E" non è più applicabile.

- I suffissi "A" e "B" in riferimento all'assenza o presenza di sintomi sistemici non sono più necessari.
- Il suffisso "X" per indicare la presenza di masse bulky non è più necessario; è invece richiesto di riportare il diametro maggiore della localizzazione principale.

## Stratificazione prognostica

I sistemi di stratificazione prognostica più utilizzati sono l'*International Prognostic Index* (IPI) e l'*age-adjusted IPI* (aaIPI).

L'IPI considera le seguenti variabili: età (superiore o inferiore a 60 anni), *performance status* secondo ECOG (0-1 *versus* 2-4), livello di LDH sierico (nella norma o aumentato), numero di sedi extranodali coinvolte (0-1 *versus* 2 o più) e stadio clinico secondo Ann Arbor (I-II *versus* III/IV). Attraverso l'assegnazione di un punto per ogni fattore di rischio clinico presente, l'IPI è in grado di stratificare i pazienti in 4 categorie di rischio: basso (0), intermedio-basso (1), intermedio-alto (2) e alto (3) con relative percentuali di sopravvivenza a 5 anni che vanno da più del 70% a meno del 25%.<sup>(16)</sup>

Per confrontare gruppi di pazienti di età inferiore a 60 anni si utilizza l'aaIPI che considera i seguenti fattori di rischio: stadio avanzato, livelli aumentati di LDH e *performance status* superiore a 1.

L'IPI fu sviluppato nel 1993 e fu validato su una coorte di pazienti trattati con sola chemioterapia CHOP. In seguito a introduzione di rituximab negli attuali schemi immunochemioterapici si è assistito a un significativo miglioramento in termini di sopravvivenza in tutti i gruppi di rischio.

È stato pertanto proposta una revisione dell'IPI (rituximab-IPI, R-IPI) che, tenendo in considerazione gli stessi parametri di rischio e

	SEDI COINVOLTE	COINVOLGIMENTO EXTRANODALE
<b>LIMITATO</b>		
<b>I</b>	Singolo linfonodo o gruppo di linfonodi adiacenti	Singola lesione extranodale, non coinvolgimento nodale
<b>II</b>	Due o più gruppi di linfonodi dallo stesso lato del diaframma	Stadio I o II con coinvolgimento di una sede extranodale per contiguità
<b>AVANZATO</b>		
<b>III</b>	Linfonodi da entrambi i lati del diaframma; linfonodi sovradiaphragmatici con coinvolgimento splenico	Non applicabile
<b>IV</b>	Sedi extranodali coinvolte non per contiguità	Non applicabile

Tabella 3 - Classificazione secondo Ann Arbor modificata secondo la classificazione di Lugano 2014<sup>(10)</sup>

mantenendo l'assegnazione di un punto per ciascuna variabile presente, è in grado di discriminare tre gruppi di rischio con outcome significativamente differente: basso (score 0), intermedio (1-2) ed elevato (3-4-5).<sup>(17)</sup> Il valore prognostico dell'IPI è stato comunque recentemente confermato attraverso una sua validazione su una coorte di 1060 pazienti arruolati in 3 trial clinici prospettici e trattati secondo schema R-CHOP.<sup>(18)</sup>

Recentemente, utilizzando i dati presenti nel database del *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) raccolti in era rituximab, è stato proposto un nuovo sistema prognostico, l'NCCN-IPI, con l'obiettivo di migliorare la stratificazione del rischio nei pazienti con DLBCL trattati con immunochimioterapia.

L'NCCN-IPI considera le stesse 5 variabili dell'IPI, ma assegna un punteggio diverso a seconda dell'età (compresa tra 40-60 anni: 1 pt; tra 60 e 75 anni: 2 pt; superiore a 75 anni: 3 pt), del livello di incremento dell'LDH (inferiore a 3 volte il valore normale: 1 pt; pari o superiore a 3 volte il valore superiore: 2 pt); assegna 1 punto in caso di coinvolgimento di almeno una sede tra midollo osseo, sistema nervoso centrale, fegato, tratto gastroenterico, polmone. Ne derivano 4 sottogruppi di rischio: basso (0-1), intermedio basso (2-3), intermedio alto (4-5), elevato (6-8 punti)<sup>(19)</sup> (Tabella 4).

## Sottotipi di DLBCL a localizzazione extranodale predominante

Alcuni sottotipi di DLBCL costituiscono un'entità autonoma caratterizzata da una presentazione predominante extranodale; tali entità sono riconosciute come entità distinte anche all'interno dalla revisione del 2016 della classificazione WHO (*World Health Organization*) delle neoplasie linfoidi<sup>(20)</sup> e richiedono uno specifico approccio terapeutico. Di seguito vengono brevemente trattati alcuni dei sottotipi più frequenti.<sup>(21)</sup>

NCCN - IPI	SCORE
<b>Età (anni)</b> 40 aa - 60 aa 61 aa - 75 aa ≥ 76 aa	1 2 3
<b>LDH</b> aumento ≤ 3 volte il valore limite aumento > 3 volte il valore limite	1 2
Stadio III - IV (Ann Arbor)	1
Malattia extranodale *	1
Performance status ≥2	1
* Interessamento osteomidollare, del SNC, epatico, polmonare, del tratto gastroenterico	

Tabella 4 - Score NCCN IPI

## Primitivo dell'encefalo

I linfomi primitivi dell'encefalo rappresentano circa l'1% dei linfomi e il 3% dei tumori dell'encefalo nel paziente immunocompetente<sup>(22, 23)</sup>. L'età media di presentazione è di 60 anni.

Il linfoma può localizzarsi a livello del parenchima encefalico, del compartimento intraoculare, ai nervi cranici, alle leptomeningi o, più raramente, al canale midollare, in assenza di localizzazioni sistemiche. La presentazione clinica è strettamente correlata alla localizzazione neuroanatomica della lesione. Più del 60% dei pazienti manifesta sintomi cognitivi, motori o sistemici; il 30% lamenta disturbi visivi, e il 20% esordisce con crisi epilettiche; la localizzazione alle leptomeningi (presente nel 15% dei pazienti all'esordio) è tipicamente asintomatica. Le localizzazioni al sistema intraoculare esordiscono con visione offuscata, riduzione dell'acuità visiva, dolore oculare, fotofobia.

L'esame più accurato per lo studio dei linfomi primitivi dell'encefalo è la risonanza magnetica nucleare con mezzo di contrasto: la maggior parte dei casi si presenta con una massa con omogeneo arricchimento contrastografico e rari segni di necrosi. Le lesioni encefaliche possono essere solitarie (65% dei casi) o multifocali (35% dei casi). Le sedi anatomiche più colpite sono gli emisferi cerebrali (40%), il talamo e i gangli della base (16%), il corpo calloso (14%), i ventricoli cerebrali e il cervelletto.

Per quanto possibile, la biopsia andrebbe effettuata prima di avviare il trattamento antiedemigeno con steroidi per evitare interferenze con la diagnosi istopatologica.

La stadiazione richiede inoltre l'esecuzione di: PET/TAC; TAC torace-collo e addome con mezzo di contrasto; rachicentesi diagnostica con studio chimico-fisico, citologico e di citometria a flusso del liquido cerebrospinale (in caso di localizzazione alla fossa posteriore è necessaria una valutazione neurochirurgica per valutarne la fattibilità); esame oftalmologico; nei pazienti anziani di sesso maschile è raccomandata un'ecografia dei testicoli.

Il sistema prognostico utilizzato è quello proposto dall'*International Extranodal Study Group* (IELSG) che considera le seguenti variabili: età (inferiore o superiore a 60 anni), performance status secondo ECOG (0-1 vs ≥2), livello di LDH sierico (normale vs aumentato), livello di proteine nel liquido cerebrospinale (normale vs aumentato), coinvolgimento di regioni profonde del sistema nervoso centrale (assente vs presente). Assegnando un punto alla presenza di ciascun fattore di rischio, si identificano tre gruppi prognostici: basso (score 0-1), intermedio (2-3) ed elevato rischio (4-5)<sup>(24)</sup>, con tassi di sopravvivenza complessiva a 2 anni rispettivamente pari a 80%, 48% e 15%. Queste forme sono gravate da prognosi sfavorevole: infatti, nonostante manifestino una discreta chemiosensibilità e radiosensibilità, spesso hanno remissioni di breve durata; inoltre, la presenza della barriera ematoencefalica riduce la penetrazione dei farmaci nel CNS e il trattamento è gravato da una significativa tossicità neurologica.

Tuttavia, la prognosi è lievemente migliorata in seguito all'uso di nuovi atteggiamenti terapeutici.

Per la rivalutazione dopo trattamento l'esame di scelta è la RMN, a cui può essere associato l'esame del liquor cefalorachidiano nei pazienti con documentato coinvolgimento liquorale all'esordio.

L'esame TAC e PET/TC è indicato solo in presenza di segni o sintomi di progressione di malattia.

### Primitivo del mediastino

Il linfoma primitivo del mediastino (*primary mediastinal B cell Lymphoma*, PMBCL) costituisce circa il 6-10% dei DLBCL. Colpisce più frequentemente soggetti giovani (l'età mediana alla diagnosi è di 35 anni) e di sesso femminile <sup>(25,26,27)</sup>.

La cellula del PMBCL origina da una cellula B timica, esprime marcatori di linea B ma non mostra immunoglobuline di superficie. Di solito, le cellule del linfoma sono CD23 positive, hanno un'espressione variabile del CD30 e sono CD15 negative. Alcune forme presentano caratteristiche molecolari, morfologiche e fenotipiche assai vicine a quelle del Linfoma di Hodgkin classico variante sclerosi nodulare, come dimostrato da studi di *gene expression profile*.

Il PMBCL si presenta frequentemente come una ampia massa a rapida crescita nel mediastino anteriore, che invade o comprime le strutture adiacenti (pleura e pericardio, parete toracica, polmoni, esofago, cuore). Solitamente all'esordio la malattia è localmente avanzata e i pazienti manifestano sintomi da compressione locale, quali dispnea, tosse, tachipnea, dolore toracico, trombosi venosa, disfagia e sindrome della vena cava superiore; spesso si associano versamento pleurico o pericardico. Sintomi sistemici si riscontrano solo nel 20% dei pazienti. La maggior parte dei pazienti ha livelli elevati di LDH. Possono inoltre essere coinvolte sedi extranodali come il rene, il fegato, le ghiandole surrenali e il sistema nervoso centrale; questa evenienza è più tipica nel caso di recidiva. Il coinvolgimento osteomidollare è infrequente, pertanto in questi casi è di fondamentale importanza escludere un DLBCL sistemico con coinvolgimento mediastinico secondario.

La diagnosi è posta su materiale istologico ottenuto mediante biopsia (in toracotomia anteriore o in mediastinoscopia) o mediante agobiopsia con ago tranciante TAC guidata.

La stadiazione utilizza il sistema classificativo di Ann Arbor e la maggior parte dei pazienti esordisce in stadio iniziale <sup>(28)</sup>. Per la valutazione prognostica si utilizza l'IPI, anche se il suo potere prognostico è limitato dalla giovane età di insorgenza del linfoma e dalla sua tendenza a localizzarsi prevalentemente nel mediastino. L'esame PET/TC è obbligatorio alla diagnosi e nella valutazione della risposta al trattamento; la PET è dotata di una elevata specificità e di un elevato valore predittivo negativo, ma è gravata da una bassa sensibilità con frequenti falsi positivi dovuti a risposta infiammatoria dei tessuti residui o a *rebound* timico. La prognosi

PUNTEGGIO	RISULTATO PET
0	Nessuna captazione
1	Captazione inferiore o uguale a quella in mediastino
2	Captazione superiore a quella del mediastino, ma inferiore a quella epatica
3	Captazione lievemente superiore a quella epatica
4	Captazione significativamente superiore a quella epatica

Tabella 5 - Criteri di Deauville della PET

di queste forme è più favorevole rispetto al DLBCL, NOS con tassi di sopravvivenza a 5 anni del 70-75% (Tabella 5).

### Primitivo cutaneo

Il DLBCL primitivo cutaneo-*leg type* (PCDLBCL-LT) è un linfoma aggressivo che rappresenta circa il 6% di tutti i linfomi cutanei. Si presenta più comunemente in età avanzata (età mediana intorno ai 70 anni) con una predilezione per il sesso femminile <sup>(29-30)</sup>.

Nel 80-90% dei casi si presenta con lesioni cutanee nodulari rapidamente progressive a livello degli arti inferiori, mentre il 10-20% può coinvolgere altre sedi cutanee, come il distretto testa-collo più frequentemente.

La storia naturale del PCDLBCL-LT è caratterizzata da frequenti ricadute ed è comune la disseminazione extracutanea, principalmente ai linfonodi, al midollo osseo e più raramente al sistema nervoso centrale. È pertanto associato ad una prognosi più sfavorevole rispetto agli altri linfomi B cutanei primitivi, con una sopravvivenza a 5 anni variabile tra 20-55%.

Uno studio retrospettivo multicentrico del gruppo francese ha analizzato 60 casi di PCDLBCL-LT con lo scopo di descriverne le caratteristiche clinico patologiche e di individuare possibili fattori prognostici: il coinvolgimento della gamba e la presenza di multiple lesioni cutanee sono risultate in un'analisi multivariata fattori prognostici sfavorevoli. La sopravvivenza globale malattia-specifica (*disease-specific overall survival*) a 5 anni è risultata pari al 41%.

Sebbene nessuna variabile correlata alla terapia è stata significativamente associata con la sopravvivenza, i pazienti trattati con chemioterapia contenente antracicline in combinazione con rituximab hanno mostrato un outcome più favorevole.

Clinicamente, i pazienti si presentano con uno o più noduli cutanei violacei su una o entrambe le gambe, o in altre sedi cutanee. Poiché una varietà di linfomi B primitivamente cutanei può presentare caratteristiche simili, tuttavia con un outcome molto diverso, la combinazione dei dati clinici e istologici risulta indispensabile per distinguere il PCDLBCL-LT con importanti implicazioni terapeutiche e prognostiche per i pazienti affetti.

## Primitivo del testicolo

Il DLBCL primitivo del testicolo (PTL) è una forma rara ed aggressiva di DLBCL extranodale e rappresenta meno del 5% delle neoplasie testicolari e l'1-2% dei LNH. L'età mediana alla diagnosi è di circa 66 anni<sup>(31,32)</sup>. Il PTL si presenta solitamente come una malattia in stadio iniziale. La maggior parte dei pazienti presenta una massa palpabile a livello di uno dei due testicoli; nel 10% dei casi si può avere un coinvolgimento di entrambi i testicoli. Vi è una tendenza ad un comportamento aggressivo con disseminazione ad altre sedi extranodali, come polmone, pleura, cute (sino al 35% dei casi) e testicoli molli. Le recidive al SNC sono frequenti e si verificano nel 30% dei casi entro 1-2 anni dall'esordio.

La stadiazione richiede, oltre al classico *workup* diagnostico e alla PET-TC, l'esecuzione dei seguenti esami: esame ecografico del testicolo controlaterale, risonanza magnetica nucleare dell'encefalo con mezzo di contrasto, rachicentesi diagnostica con studio citologico e citometrico del liquido cerebrospinale.

L'orchietomia è fondamentale a scopo diagnostico e terapeutico. È anche raccomandato un esame accurato della cute poiché sono

state descritte associazioni tra il PCDLBCL-LT e il DLBCL primitivo testicolare.

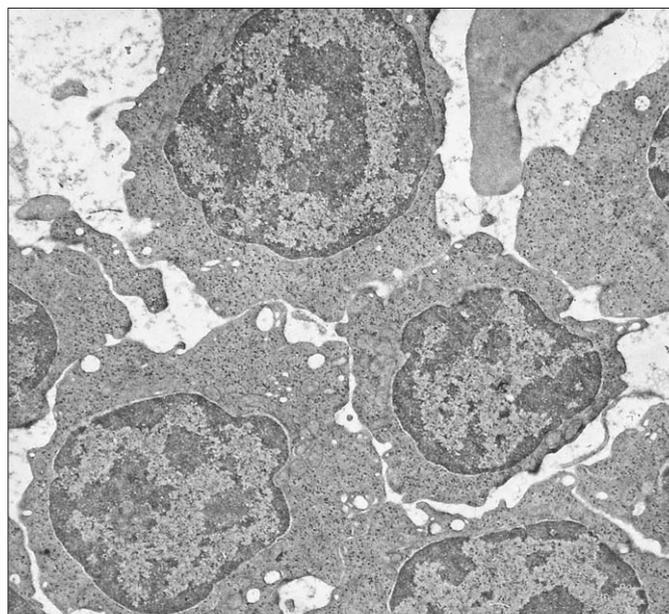
L'attuale *gold standard* terapeutico è rappresentato dalla chemioterapia contenente antracicline in associazione a rituximab. La radioterapia sul testicolo coinvolto deve essere effettuata nei casi in cui non sia stata eseguita l'orchietomia. La radioterapia profilattica sul testicolo contro laterale e sullo scroto (dosaggio 25-30 Gy) è fortemente raccomandata poiché riduce il tasso di recidiva. Tale trattamento è associato con un rischio significativo di ipogonadismo, per cui è indicato il monitoraggio dei livelli di testosterone ed eventuale terapia ormonale sostitutiva nei casi sintomatici. Inoltre, una profilassi per il rischio di coinvolgimento del SNC può essere aggiunta alla terapia standard.

La rivalutazione dopo trattamento prevede l'esecuzione dell'esame PET/TC. Nei pazienti ricaduti o refrattari deve essere considerata in primo luogo l'opzione del trapianto autologo delle cellule staminali preceduto da chemioterapia ad alte dosi, se fattibile. Tuttavia, la maggior parte dei pazienti è rappresentata da soggetti anziani: in tale setting deve essere incoraggiata la partecipazione a trial clinici con i nuovi farmaci emergenti.

## Bibliografia

1. Morton L M, Turner JJ, Cerhan J R, Linet MS, Treseler PA, Clarke C et al. Proposed classification of lymphoid neoplasms for epidemiologic research from the Pathology Working Group of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood*. 2007;110(2):695-708.
2. <http://www.seer.cancer.gov>.
3. Fisher SG, Fisher RI. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*. 2004;23(38):6524-34.
4. Arcaini L, Rossi D, Lucioni M, Nicola M, Brusca A, Fiaccadori F et al. The NOTCH pathway is recurrently mutated in diffuse large B-cell lymphoma associated with hepatitis C virus infection. *Haematologica*. 2015;100(2):246-252.
5. Martelli M, Ferreri AJ, Agostinelli C, Di Rocco A, Pfreundschuh M, Pileri SA. Diffuse large B-cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;87(2):146-71.
6. Castillo JJ1, Winer ES, Olszewski AJ. Sites of extranodal involvement are prognostic in patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: an analysis of the Surveillance, Epidemiology and End Results database. *Am J Hematol*. 2014;89(3):310-4.
7. Yao Z, Deng L, Xu-Monette ZY, Manyam GC, Jain P, Tzankov A et al. Concordant bone marrow involvement of diffuse large B-cell lymphoma represents a distinct clinical and biological entity in the era of immunotherapy. *Leukemia*. 2018;32(2):353-363.
8. Hehn ST, Grogan TM, Miller TP. Utility of Fine-Needle Aspiration as a Diagnostic Technique in Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2004;22(15):3046-52.
9. Tucci A, Martelli M, Rigacci L, Riccomagno P, Cabras MG, Salvi F et al. Comprehensive geriatric assessment is an essential tool to support treatment decisions in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a prospective multicenter evaluation in 173 patients by the Lymphoma Italian Foundation (FIL). *Leuk Lymphoma*. 2015;56(4):921-6.
10. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, Lister TA et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059-68.
11. Barrington SF, Mikhael NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müller SP et al. Role of Imaging in the Staging and Response Assessment of Lymphoma: Consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3048-58.
12. Carr R, Barrington SF, Madan B, O'Doherty MJ, Saunders CA, van der Walt J et al. Detection of lymphoma in bone marrow by whole-body positron emission tomography. *Blood*. 1998;91(9):3340-6.
13. Khan AB, Barrington SF, Mikhael NG, Hunt AA, Cameron L, Morris T et al. PET-CT staging of DLBCL accurately identifies and provides new insight into the clinical significance of bone marrow involvement. *Blood*. 2013;122(1):61-7.
14. Pelosi E, Penna D, Douroukas A, Bellò M, Amati A, Arena V et al. Bone marrow disease detection with FDG-PET/CT and bone marrow biopsy during the staging of malignant lymphoma: results from a large multicentre study. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2011;55(4):469-475.
15. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26(S5):v116-25.
16. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The international non-hodgkin's lymphoma prognostic factors project. *N Engl J Med*. 1993;329(14):987-994.
17. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109(5):1857-61.
18. Ziepert M, Hasenclever D, Kuhnt E, Glass B, Schmitz N, Pfreundschuh M et al. Standard International Prognostic Index Remains a Valid Predictor of Outcome for Patients With Aggressive CD20+ B-Cell Lymphoma in the Rituximab Era. *J Clin Oncol* 2010;28(14):2373-80.
19. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood*. 2014;123(6):837-842.

20. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;19;127(20):2375-90.
21. Vitolo U, Seymour JF, Martelli M, Illerhaus G, Illidge T, Zucca E et al. Extranodal diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and primary mediastinal B-cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016;27(suppl 5):v91-v102.
22. Hoang-Xuan K, Bessell E, Bromberg J, Hottinger AF, Preusser M, Rudà R et al. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma in immunocompetent patients: guidelines from the European Association for Neuro-Oncology. *Lancet Oncol*. 2015;16(7):e322-32.
23. Rubenstein JL, Gupta NK, Mannis GN, Lamarre AK, Treseler P. How I treat CNS lymphomas. *Blood*. 2013;122(14):2318-2330.
24. Ferreri AJ1, Blay JY, Reni M, Pasini F, Spina M, Ambrosetti A et al. Prognostic Scoring System for Primary CNS Lymphomas: The International Extranodal Lymphoma Study Group Experience. *J Clin Oncol*. 2003;21(2):266-72.
25. Dabrowska-Iwanicka A, Walewski JA. Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep*. 2014;9(3):273-83.
26. van Besien K, Kelta M, Bahaguna P. Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: A Review of Pathology and Management. *J Clin Oncol*. 2001;19(6):1855-64.
27. Hamlin PA. Evolving Treatment Paradigms for Primary Mediastinal Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(17):1751-3.
28. Zinzani PL, Martelli M, Bertini M, Gianni AM, Devizzi L, Federico M et al. Induction chemotherapy strategies for primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis: a retrospective multinational study on 426 previously untreated patients. *Haematologica*. 2002;87(12):1258-64.
29. Grange F, Beylot-Barry M, Courville P, Maubec E, Bagot M, Vergier B et al. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type: clinicopathologic features and prognostic analysis in 60 cases. *Arch Dermatol*. 2007;143(9):1144-50.
30. Hristov AC. Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type: diagnostic considerations. *Arch Pathol Lab Med*. 2012;136(8):876-81.
31. Cheah CY, Wirth A, Seymour JF. Primary testicular lymphoma. *Blood*. 2014;123(4):486-93.
32. Zucca E, Conconi A, Mughal TI, Sarris AH, Seymour JF, Vitolo U et al. Patterns of outcome and prognostic factors in primary large-cell lymphoma of the testis in a survey by the International Extranodal Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 2003;21(1):20-7.



*DLBCL: sezione di linfonodo al ME a trasmissione  
(Archivio di G. Lambertenghi Deliliers)*

### Parole Chiave

Linfoma a grandi cellule B diffuso, presentazione clinica, linfoma extranodale.

### Indirizzi per la corrispondenza

**Luca Arcaini**  
Clinica Ematologica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo  
Università degli Studi di Pavia, P.le Golgi 19, 27100 Pavia



# Standard terapeutici e nuove prospettive



Vittoria Tarantino<sup>1</sup>, Stefano Luminari<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Medico Chirurgiche Materno Infantile e dell'Adulto, Università di Modena e Reggio Emilia, Modena

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Diagnostica, Clinica e di Sanità Pubblica, Università di Modena e Reggio Emilia, Reggio Emilia

<sup>3</sup> Ematologia, Azienda Sanitaria Locale, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Reggio Emilia

## Introduzione

Il linfoma diffuso a grandi cellule (DLBCL) è il più frequente tra i linfomi non Hodgkin e colpisce tipicamente soggetti di età medio-avanzata. Negli anni più recenti, alcuni momenti fondamentali hanno segnato l'evoluzione delle terapie dei pazienti con DLBCL, permettendo di identificare questo tipo di linfoma come malattia trattabile e guaribile nei due terzi circa dei casi. Negli anni '90 lo schema polichemioterapico CHOP (ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone) è stato identificato come il trattamento di riferimento per la terapia di prima linea dei DLBCL così come di altri linfomi aggressivi<sup>(1)</sup>. Un secondo passaggio importante è stata la dimostrazione della maggiore efficacia della chemioterapia ad alte dosi rispetto alla terapia convenzionale per i pazienti con linfoma aggressivo recidivato o refrattario<sup>(2)</sup> che permetteva di "salvare" circa il 30-50% dei pazienti e che ha eletto l'autotrapianto di midollo a terapia standard per i pazienti recidivati. Infine ulteriore e fondamentale passaggio è stata la dimostrazione dell'efficacia della immunochemioterapia rispetto alla sola chemioterapia realizzata con l'aggiunta dell'anticorpo monoclonale anti CD20 rituximab (R)<sup>(3-5)</sup> allo schema CHOP. Con l'utilizzo dello schema immunochemioterapico R-CHOP è oggi possibile ottenere risposte complete nel 75% circa dei casi che si traducono in tassi di sopravvivenza a lungo termine pari al 60-70% circa di tutti i pazienti.

Oltre al miglioramento delle terapie farmacologiche vanno sottolineati altri elementi fondamentali che hanno contribuito al miglioramento recente della gestione terapeutica dei pazienti con DLBCL. In primo luogo lo studio dei fattori prognostici ha consentito lo sviluppo dell'indice prognostico internazionale IPI e le sue successive evoluzioni (R-IPI, NCCN-IPI) e ha posto le basi per lo sviluppo di strategie terapeutiche basate sul rischio individuale del paziente ottimizzando il rapporto tra i rischi e i benefici della cura<sup>(6-8)</sup>.

Un secondo elemento è dato dal miglioramento della valutazione

dell'estensione della malattia e della risposta ai trattamenti ottenuto con l'utilizzo della FDG-PET. Nella recente revisione dei criteri di valutazione della risposta ai trattamenti, la lettura della FDG-PET eseguita con i criteri di Deauville a fine terapia è confermata per tutti i pazienti con DLBCL in virtù dell'importante ruolo prognostico associato alla risposta metabolica<sup>(9)</sup>. Il terzo elemento di rilievo, che tuttavia non si è ancora tradotto in una modifica delle scelte terapeutiche, è rappresentato dal miglioramento delle conoscenze sulla biologia del DLBCL, che ha permesso di identificare alcuni sottotipi di DLBCL associati a caratteristiche cliniche e sopravvivenza differenti che sono attualmente oggetto di intensa attività di ricerca e che in un prossimo futuro potrebbero guidare un ulteriore miglioramento della gestione dei pazienti. Tra questi lo studio della cellula d'origine (COO) e l'espressione o la traslocazione combinata di cMyc e Bcl2<sup>(10,11)</sup>.

In questo lavoro di revisione verranno illustrate le principali modalità di trattamento dei pazienti con DLBCL partendo da una suddivisione dei pazienti in diversi gruppi di rischio (Figura 1). Verranno inoltre affrontati altri temi importanti come la terapia del paziente grande anziano o fragile e verranno discussi i dati disponibili per la gestione dei principali sottotipi istologici di DLBCL e la profilassi delle recidive al sistema nervoso centrale. Verrà infine affrontato il problema del paziente recidivato o refrattario.

## Pazienti giovani in stadio localizzato o a basso rischio (aaIPI = 0-1)

Nei pazienti giovani con malattia a basso rischio o in stadio localizzato i principali temi di discussione sono rappresentati dalla durata della terapia e dalla necessità di eseguire radioterapia di consolidamento dopo immunochemioterapia.

Il ruolo della terapia R-CHOP rispetto alla sola chemioterapia CHOP è stato dimostrato nell'ambito dello studio randomizzato

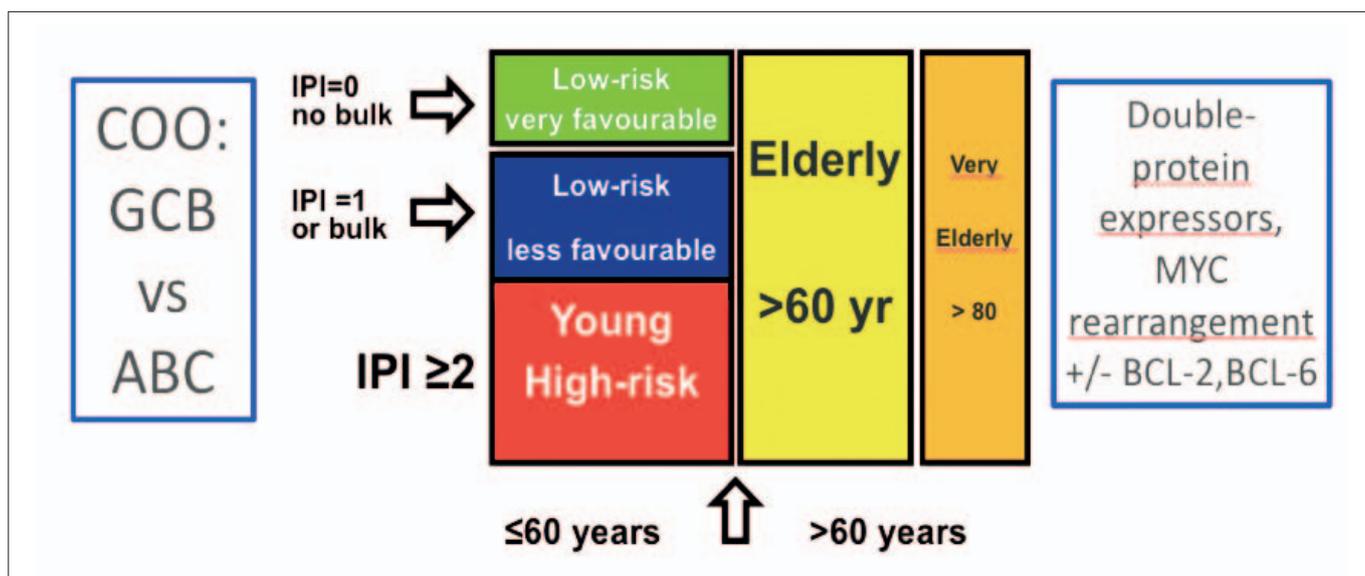


Figura 1 - Suddivisione dei pazienti in gruppi di rischio.

MInT in una popolazione di 823 pazienti con età compresa fra i 18 e i 60 anni. Nel dettaglio i pazienti presentavano 0 o 1 fattore di rischio per *Age Adjusted* IPI o avevano una malattia localizzata con lesione bulky (definita in presenza di lesioni con diametro superiore ai 10 cm). Dallo studio è emerso che un regime di immunochemioterapia somministrato per un totale di 6 cicli permetteva di ottenere un vantaggio in termini sia di *Progression Free Survival* (PFS) che di sopravvivenza globale (OS) rispetto alla sola polichemioterapia. I dati a lungo termine hanno confermato l'ottima curabilità di questi pazienti documentata da una OS a 6 anni del 90% per R-CHOP<sup>(12)</sup>. Questo stesso studio ha inoltre permesso di identificare due differenti sotto-categorie di pazienti: una più favorevole che comprende pazienti con aaIPI 0 e senza malattia bulky e una meno favorevole che comprende i pazienti con IPI 1, presenza di malattia bulky o entrambi. Dall'analisi per sottogruppi dello studio MInT i pazienti con IPI 0 ma con malattia bulky mostravano un beneficio dall'aggiunta della radioterapia che riduceva ma non annullava il ruolo prognostico negativo del bulky. Per questo motivo gli stessi autori hanno avviato un secondo studio, noto con l'acronimo UNFOLDER, per verificare l'efficacia di un consolidamento con RT su malattia bulky rispetto alla sola osservazione dopo 6 cicli R-CHOP21 o 14. Lo studio non è ancora concluso ma dai risultati preliminari è emerso un eccesso di progressioni per il braccio osservazionale che ha giustificato un emendamento del trial raccomandando il consolidamento con RT per tutti i pazienti con malattia bulky (NCT00278408).

A commento di questa decisione bisogna tuttavia sottolineare che nello studio UNFOLDER la valutazione della risposta era basata sull'utilizzo della TAC e non prevedeva la valutazione metabolica con PET, pratica oggi ampiamente diffusa. Una seconda generazione di studi clinici attualmente in corso sta valutando il ruolo della ra-

dioterapia di consolidamento nei pazienti con malattia Bulky che ottengono risposta metabolica completa a fine trattamento.

Analizzando i primi dati disponibili è possibile ipotizzare che la radioterapia non offra un vantaggio significativo nei pazienti con malattia Bulky che ottengono una risposta metabolica completa<sup>(13,14)</sup>. Analogamente, per quanto riguarda la durata del trattamento immunochemioterapico, in alternativa ai 6 cicli standard sono proposti trattamenti più brevi con solo 4 cicli di immunochemioterapia R-CHOP negli stadi localizzati: una risposta a questo quesito giungerà dai dati finali dello studio FLYER del gruppo tedesco in cui sono arruolati pazienti con DLBCL in stadio localizzato e/o IPI 0 e che prevede un confronto randomizzato tra 6 vs 4 cicli di trattamento (NCT00278421).

In attesa della pubblicazione dei dati definitivi di questi studi il trattamento standard dei pazienti con DLBCL in stadio localizzato dovrebbe prevedere la somministrazione di un programma completo di 4-6 cicli R-CHOP con indicazione al consolidamento con radioterapia nei casi con residuo PET positivo a fine cura. L'omissione della radioterapia nei casi che ottengono una risposta metabolica completa andrebbe valutata nell'ambito di una discussione multidisciplinare considerando il rapporto rischio/beneficio del singolo caso.

## Malattia in stadio avanzato

Il trattamento di riferimento per i pazienti con DLBCL in stadio avanzato e con età inferiore a 80 anni è rappresentato da 6-8 cicli del regime R-CHOP somministrato a intervalli di 3 settimane (R-CHOP21).

Lo schema R-CHOP è risultato più efficace rispetto alla sola chemioterapia CHOP per tutti gli end-point analizzati (RC, PFS e OS) e il miglioramento è stato confermato anche nelle analisi condotte dopo follow up prolungato nel primo di una serie di studi rando-

mizzati pubblicati nei primi anni 2000<sup>(3)</sup>. Negli anni seguenti sono stati eseguiti numerosi tentativi per provare a migliorare l'efficacia dello schema R-CHOP21 ma ad oggi nessuno ha avuto successo. I principali studi hanno valutato il ruolo di terapie *dose-dense*, di terapie infusionali *dose-adjusted*, di modifiche della modalità di somministrazione del rituximab; più recentemente si sono aggiunti studi in cui si è cercato di aumentare l'efficacia di R-CHOP mediante l'aggiunta di nuovi farmaci.

### Terapie intensificate

Dalla fine degli anni '90 si è dibattuto molto sul possibile ruolo di regimi *dose-dense* somministrati ogni 14 giorni come alternativa allo schema trisettimanale in virtù dei dati promettenti ottenuti in una casistica di pazienti anziani con DLBCL trattata nell'ambito dello studio RICOVER-60 del gruppo tedesco.<sup>(15)</sup> La risposta definitiva al quesito è fornita da 2 studi randomizzati che hanno eseguito un confronto diretto tra R-CHOP21 e R-CHOP14: un primo studio (LNH03-6B) è stato condotto dal gruppo francese GELA e ha arruolato 662 pazienti anziani (> 60 anni); un secondo studio è stato condotto dagli inglesi del *British National Lymphoma Investigation* e ha arruolato 1080 pazienti senza imporre limiti di età. I risultati di entrambi gli studi che nel complesso hanno studiato più di 1600 pazienti, non hanno messo in luce alcuna differenza significativa fra i due bracci di terapia in termini di efficacia. La sopravvivenza globale a 3 anni è stata del 69% *vs* 72% ( $p=0,7487$ ) per lo studio GELA, mentre è stata di 82,7% per RCHOP14 *vs* 80,8% in RCHOP 21 nello studio inglese ( $p=0,3763$ ). Dato comune a entrambi gli studi è stata la maggiore tossicità per i pazienti trattati con il trattamento *dose-dense*<sup>(16,17)</sup>.

Un possibile ruolo per trattamenti intensificati è stato ipotizzato nel gruppo dei pazienti giovani ad elevato rischio IPI che, trattati con la terapia standard (R-CHOP), presentano minori probabilità di guarigione rispetto a gruppi a rischio intermedio basso. In particolare gli sforzi si sono concentrati sull'uso di schemi *dose-dense* e di terapie ad alte dosi seguite da trapianto autologo di cellule staminali (HDC e ASCT) come consolidamento alla terapia di prima linea.

La dimostrazione dell'efficacia di regimi più intensificati emerge da uno studio francese, che ha messo a confronto lo schema R-ACVBP (rituximab, doxorubicina, ciclofosfamide, vindesina, bleomicina e prednisone) con lo standard R-CHOP in 380 pazienti che presentavano 1 solo fattore prognostico avverso secondo aaIPI (nel 55% dei casi il singolo fattore di rischio era dato dalla presenza di uno stadio III-IV). Lo studio ha permesso di dimostrare un miglioramento dell'*event free survival* (81% *vs* 67% rispettivamente  $p=0,035$ ) e un vantaggio in sopravvivenza globale (92% *vs* 84%  $p=0,0071$ ) con lo schema intensivo. A svantaggio dello schema *dose-dense* è tuttavia da sottolineare il profilo di rischio favorevole dei pazienti trattati, che ne limita l'applicabilità, ma soprattutto il peggiore profilo di tossicità dello schema intensificato, associato ad un maggior nu-

mero di eventi acuti e tardivi che ne hanno limitato l'uso nella pratica clinica al di fuori dei confini francesi<sup>(18,19)</sup>.

Altri gruppi hanno valutato il ruolo del trapianto autologo come consolidamento nei pazienti ad alto rischio secondo aaIPI.

Il razionale per l'utilizzo di terapie ad alte dosi deriva dai dati promettenti di studi di fase II, i più recenti dei quali prevedevano l'utilizzo di immunochemioterapia nell'ambito di schemi ad alte dosi sequenziali<sup>(20,21)</sup>. Ad oggi sono disponibili i risultati di alcuni studi randomizzati. Lo studio tedesco DSHNHL-2002-1 ha confrontato il regime R-CHOEP 14 (rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, etoposide e prednisone) con il medesimo regime a dosaggio intensificato (R-Mega CHOEP) (R-CHOEP con dose aumentata di ciclofosfamide, etoposide e doxorubicina) seguito da supporto di cellule staminali in 273 giovani ad alto rischio. I risultati a 2 anni non hanno permesso di evidenziare un vantaggio né in termini di sopravvivenza globale, né di PFS a discapito invece di una maggiore tossicità per il regime R-Mega CHOEP<sup>(22)</sup>.

Lo studio condotto dall'intergruppo americano/canadese SWOG-9704 prevedeva, per pazienti a rischio intermedio-alto, la randomizzazione dopo 5 cicli di chemioterapia (R)-CHOP, tra ulteriori 3 cicli di (R)-CHOP e un solo ciclo addizionale seguito da BEAM e autotrapianto. Lo studio, in cui circa la metà dei pazienti aveva ricevuto schemi contenenti rituximab, ha permesso di documentare un beneficio per la PFS a vantaggio della terapia ad alte dosi. Il migliore controllo di malattia non si è tuttavia tradotto in un vantaggio in termini di OS probabilmente per effetto di efficaci terapie di salvataggio per i pazienti recidivati<sup>(23)</sup>.

Analoghi risultati sono stati ottenuti dal gruppo italiano GITIL che ha confrontato in uno studio randomizzato in 246 pazienti a rischio intermedio-alto, 8 cicli di RCHOP14 con un trattamento sequenziale ad alte dosi associato a rituximab (R-HDS). Dopo un follow up mediano di 5 anni, non è stata riscontrata alcuna differenza in termini di PFS (65% *v* 75%;  $p = 0,12$ ) o OS (74% *v* 77%,  $p=0,64$ ) ma i pazienti trattati con R-HDS hanno registrato un maggior numero di tossicità ematologiche e di complicanze infettive ( $p < 0,001$ )<sup>(24)</sup>.

Infine è stato recentemente pubblicato lo studio DLCL04 del gruppo FIL che ha risposto con un disegno 2x2 a un doppio quesito sull'intensificazione della chemioimmunoterapia (RCHOP 14 o R-MegaCHOP 14) e sul consolidamento con terapia ad alte dosi. Dai risultati è emerso un miglioramento della PFS in favore dell'intensificazione con R-HDC e trapianto senza tuttavia mostrare alcuna differenza in termini di OS<sup>(25)</sup>.

In conclusione dai risultati emersi dagli studi di fase III, nel paziente giovane con aaIPI 2-3 la HDC non dovrebbe essere utilizzata routinariamente e un regime chemioimmunoterapico con R-CHOP somministrato a cicli di 21 giorni rimane ancora oggi lo standard di trattamento.

L'intensificazione resta comunque un'opzione valida per i pazienti

che rientrano nella categoria “*Very high risk*” come i *double hit* o per tutti quei pazienti che non raggiungono una risposta completa al termine dell’induzione.

### Terapie infusionali *dose-adjusted*

L'utilizzo di schemi infusionali che prevedono l'aggiustamento della dose in base alla tossicità ematologica osservata è stato promosso dai ricercatori del NCI che hanno sviluppato lo schema R-DA-EPOCH (rituximab, etoposide, prednisone, vincristina, ciclofosfamide e doxorubicina). Questo regime ha dimostrato un'importante attività anti-linfoma in 69 pazienti affetti da DLBCL con IPI intermedio-alto. Nel dettaglio i risultati migliori sono stati segnalati nel gruppo GCB dove la sopravvivenza a 5 anni si attestava intorno al 94% rispetto al 68% dei Non GCB <sup>(26,27)</sup>. Analoghi dati promettenti sono stati osservati per la terapia di pazienti con linfoma di Burkitt e in pazienti con linfoma mediastinico. I risultati di questi studi hanno portato i ricercatori del NCI a condurre uno studio randomizzato di confronto con R-CHOP. I risultati di questo studio sono stati recentemente presentati e anche in questo caso non sono emerse differenze in termini di efficacia <sup>(28)</sup>. Come già osservato negli altri studi randomizzati ancora una volta lo schema R-CHOP si è confermato lo schema associato a minore incidenza di effetti collaterali. È ancora in corso un'analisi esplorativa dello stesso studio volta a valutare l'attività dei due schemi chemioterapici in pazienti con profilo clinico, genetico e molecolare diverso valutato con l'analisi della cellula di origine, con l'espressione delle proteine BCL2 e MYC (*double-expressor*) e con la ricerca del riarrangiamento di *cMYC*, *BCL2* e/o *BCL6* (*doubletriple hit lymphoma*) <sup>(29)</sup>.

### Nuovi farmaci

I nuovi farmaci rappresentano una risorsa importante per provare a migliorare l'efficacia dei trattamenti. Alcuni tentativi sono stati condotti per provare a incrementare l'efficacia di R-CHOP operando sia sulla componente immunoterapica sia sulla parte di terapia citostatica. Di seguito si riportano i dati ottenuti con studi che hanno modificato operando sull'anticorpo monoclonale antiCD20. I risultati ottenuti con l'aggiunta di nuovi farmaci alla chemioterapia verranno affrontati nei paragrafi sulle terapie basate sulla cellula d'origine.

Obinutuzumab (Ga101) è un anticorpo monoclonale anti CD20 umanizzato che rispetto al rituximab presenta maggiore affinità per il recettore e maggiore attività citotossica diretta documentata da studi in vitro <sup>(30)</sup>. Questo farmaco è stato inizialmente identificato come il naturale erede del rituximab e nel corso degli ultimi anni ne è stato esplorato il ruolo sostituendolo al predecessore negli schemi di immunochemioterapia. La maggiore efficacia dei trattamenti contenenti obinutuzumab rispetto a rituximab è stata dimostrata da grandi studi randomizzati per i pazienti con linfoma follicolare e per i pazienti anziani con leucemia linfatica cronica <sup>(31,32)</sup>. Nello studio randomizzato di fase III GOYA l'ipotesi della maggiore efficacia

dell'immunochemioterapia obinutuzumab - CHOP rispetto al tradizionale R-CHOP è stata testata su 1.200 pazienti con DLBCL. I risultati dello studio sono stati recentemente pubblicati e diversamente dalle attese non hanno permesso di migliorare i risultati della terapia standard <sup>(33)</sup>.

Altri studi hanno recentemente confrontato la somministrazione di R-CHOP con rituximab endovenosa rispetto all'uso di rituximab in formulazione sottocutanea o rispetto all'utilizzo di biosimilari del rituximab. Lo studio MabEase ha confrontato in maniera randomizzata e con un'ipotesi di non inferiorità l'attività di rituximab sottocute e ha permesso di dimostrare che è possibile utilizzare la formulazione sottocutanea di rituximab senza perdere in efficacia rispetto a quella endovenosa ma permettendo di ottimizzare i tempi di somministrazione del trattamento in ospedale <sup>(34)</sup>. Analogamente i farmaci biosimilari del rituximab sono stati confrontati con la molecola *originator* in studi randomizzati in combinazione a CHOP e hanno confermato analoga efficacia <sup>(35-37)</sup>.

### Paziente anziano

In base agli studi randomizzati disponibili lo schema R-CHOP è chiaramente identificato come standard per tutti i pazienti fino agli 80 anni d'età, limite massimo ammesso nei trial randomizzati precedentemente citati. Le evidenze degli studi randomizzati non possono pertanto essere trasferite in maniera diretta alla popolazione di pazienti ultra 80enni che oltre a rappresentare un gruppo numeroso di casi offrono importanti sfide gestionali per il clinico. Il problema maggiore è rappresentato dalla possibilità di somministrare terapia a dosi piene e con intento curativo per la presenza, oltre al linfoma, di co-patologie, di situazioni di inabilità o ridotta funzione che condizionano in maniera significativa la scelta terapeutica con effetti sulla sopravvivenza <sup>(38)</sup>. All'osservazione clinica va inoltre aggiunta la più alta percentuale del sottotipo ABC nei pazienti di età superiore ai 60 anni osservata in alcuni studi <sup>(11,39)</sup> che si associa ad una maggiore complessità genetica della malattia.

Come descritto in un ampio studio di popolazione, anche per i pazienti anziani l'utilizzo di schemi contenenti antracicline rappresenta la strategia di riferimento e quella associata ad una migliore sopravvivenza. Diversamente dal paziente giovane tuttavia, nell'anziano si ricorre spesso ad aggiustamenti di dose o a scelte empiriche di sostituzione di farmaci con l'obiettivo di migliorare la tollerabilità del trattamento <sup>(40)</sup>. In questo contesto diventa indispensabile rendere oggettive le specifiche dimensioni che nel singolo paziente possono renderlo più o meno adatto a ricevere un trattamento con intento curativo. A tal fine può essere utile valutare il paziente tramite strumenti di valutazione geriatria multidimensionale (VGM) per identificare in maniera oggettiva e riproducibile i diversi pazienti. In particolare come già attuato in altri linfomi o nella leucemia linfatica cronica è possibile ipotizzare la presenza di pazienti FIT, funzional-

mente indipendenti e privi di comorbidità, eleggibili a trattamenti con intento curativo di tipo standard; pazienti *unfit*, con riserve d'organo tali da imporre riduzione di dose dei farmaci o l'utilizzo di farmaci a basso profilo di tossicità; pazienti fragili, con importanti limitazioni funzionali e/o comorbidità, candidati a ricevere terapia a finalità palliativa (Figura 2).

L'utilizzo della valutazione geriatrica multidimensionale, all'interno di studi prospettici, quale strumento per definire in maniera standardizzata la categoria di rischio di ogni paziente, rappresenta oggi un valido approccio alla gestione del paziente anziano con DLBCL ed è l'oggetto di un ampio studio osservazionale prospettico della Fondazione Italiana Linfomi (*Elderly Project*) che fornirà risposte più chiare sull'argomento.

Relativamente alle opzioni terapeutiche attualmente disponibili i dati più interessanti sono quelli forniti dal gruppo francese con lo studio del regime R-mini-CHOP. Si tratta di un regime derivato da R-CHOP in cui vengono dimezzate le dosi dei farmaci citostatici mentre è lasciata invariata la dose del farmaco rituximab. Lo studio è stato condotto in 149 pazienti affetti da DLBCL di età superiore agli 80 anni ottenendo un mediana di OS e PFS rispettivamente di 29 e 21 mesi<sup>(41)</sup> al costo di tossicità ematologica ed extraematologica accettabile (neutropenia severa in 59 pazienti, neutropenia febbrile in 11 casi). Considerando questi risultati oggi il regime R-mini-CHOP è considerato da molti lo standard per i pazienti con DLBCL oltre gli 80 anni d'età. Ulteriori possibilità per il trattamento del paziente anziano non candidabile a R-CHOP prevedono la sostituzione della doxorubicina convenzionale con la forma liposomiale o con etoposide. Il regime R-COMP con doxorubicina liposomiale non peghilata è stato valutato in numerosi studi prospettici, riducendo la tossicità del trattamento senza modificarne l'efficacia come mostrato dallo studio EURO 18 condotto su 75 pazienti anziani con una PFS a 3 anni del 69%<sup>(42)</sup>. Lo stesso regime R-COMP è stato recentemente valutato in uno studio di fase II della FIL che ha arruolato 50 pazienti che, per comorbidità cardiaca, non erano can-

didati a ricevere trattamento con doxorubicina convenzionale. In questo studio il regime R-COMP si è dimostrato attivo confermandosi una valida opzione terapeutica in pazienti cardiopatici ma non ha annullato del tutto il rischio di eventi cardiologici maggiori<sup>(43)</sup>.

Lo schema R-CEOP con etoposide è stato pubblicato dal gruppo canadese mostrando buoni dati di efficacia (*Complete response rate*, CRR e *overall response rate*, ORR, OS e PFS) e tossicità<sup>(44)</sup>. In un confronto non randomizzato con una coorte storica di pazienti trattati con R-CHOP, non sono emerse differenze significative, suggerendo tuttavia una maggiore efficacia di R-CEOP nei pazienti con DLBCL di tipo GCB<sup>(45)</sup>.

Oltre agli schemi citati che mostrano un profilo ideale per mantenere l'intento curativo sono disponibili numerosi studi che hanno utilizzato schemi a tossicità ridotta, più adatti per popolazioni di soggetti fragili. Tali schemi prevedono l'utilizzo di farmaci come la bendamustina, la gemcitabina, o il regime (ciclofosfamide, vincristina, prednisone) CVP<sup>(46-48)</sup> associati con rituximab che consentono di ottenere risposte nel 30-40% dei casi senza eccessiva tossicità.

Aspetto importante nella gestione del paziente anziano è rappresentato dalla tossicità precoce del trattamento che si traduce in un incremento di eventi maggiori più comunemente nei primi 3 cicli di trattamento<sup>(41)</sup>. A tal fine è rilevante l'utilizzo di trattamenti di "pre-fase" al fine di preparare il paziente a ricevere il trattamento chemioterapico riducendo al tempo stesso alcune tossicità acute del trattamento. Elemento comune a diversi trattamenti di pre-fase è l'utilizzo di prednisone nei 7 giorni precedenti l'inizio del trattamento cui può essere associata una dose di 1-2 mg di vincristina, anticipando la somministrazione prevista con il regime CHOP.

In uno studio di fase II condotto dal gruppo Lysa, 120 pazienti con età media di 83 anni hanno ricevuto un trattamento mini-CHOP associato a ofatumumab, anticorpo monoclonale umanizzato anti-CD20, preceduto da una pre-fase con vincristina (1 mg) e prednisone (40mg/m<sup>2</sup> dd -7 -4) allo scopo di ridurre le tossicità precoci. Dopo un follow up mediano di 26,6 mesi, l'associazione di immu-

MISURA	FIT	UNFIT	FRAIL
ADL	6	5*	≤4*
IADL	8	7- 6*	≤5*
CIRS	0 score = 3-4 < 5 score = 2	0 score = 3-4 5-8 score = 2	1 score = 3-4 > 8 score = 2
ETÀ		≥ 80 fit	≥ 80 unfit

\* n. di funzioni residue

Figura 2 - Strumento per la valutazione dei pazienti anziani sulla base di criteri cronologici, di valutazione dell'ADL, dell'IADL e delle comorbidità.

nochemioterapia con OFA-mini-CHOP preceduta da pre-fase si è mostrata efficace e sicura. Dal confronto con il dato storico prodotto dallo stesso gruppo con lo schema R-mini-CHOP un dato di interesse è stato la riduzione della mortalità precoce, che è stata azzerata nel secondo trial<sup>(49)</sup>. La spiegazione più plausibile per quanto osservato sembra essere l'effetto protettivo della terapia di pre-fase che dovrebbe quindi essere utilizzata in tutti i pazienti anziani prima di avviare un programma di immunochemioterapia.

## Terapie basate sulla cellula d'origine e su sottogruppi molecolari

Una più profonda conoscenza dei meccanismi biologici e molecolari della patologia ha permesso di riconoscere una discreta eterogeneità biologica nell'ambito dei casi di DLBCL. In base alle caratteristiche di un'ipotetica cellula d'origine sono distinguibili casi di DLBCL derivanti dal centro germinativo (GCB), e casi con origine da elementi linfocitari attivati (ABC)<sup>(50)</sup>. Inoltre in base all'espressione combinata delle proteine *c-MYC* e *BCL2* sono identificati i casi cosiddetti *double expressor* di cui fa parte anche il piccolo gruppo dei casi *double-hit* costituito dai casi che presentano la doppia traslocazione cromosomica  $t(14;18)$  e  $t(8;14)$ . Oltre che per la diversità biologica, i gruppi si correlano a un diverso outcome clinico che appare essere peggiore nei pazienti *double hit*, intermedio per i casi ABC e/o *double expressor* e migliore per i GCB<sup>(11, 51-53)</sup>.

Con gli studi clinici più recenti si è esplorata la possibilità di migliorare la sopravvivenza dei pazienti con DLBCL, adattando i trattamenti ai diversi istotipi di DLBCL. Il razionale per questo tipo di approccio deriva da studi di fase II che hanno dimostrato l'attività selettiva dei nuovi farmaci aggiunti allo schema R-CHOP nei singoli istotipi e hanno costituito il razionale per condurre studi randomizzati. Tra i farmaci studiati quelli che sono stati trasferiti a studi randomizzati elenchiamo il bortezomib, la lenalidomide e l'ibrutinib. Il bortezomib, è un inibitore del proteosoma, coinvolto nella via di trasduzione del segnale NF- $\kappa$ B, i cui fattori associati sono coinvolti nella patogenesi dei casi di DLBCL non GCB. Il gruppo inglese ha recentemente presentato i risultati dello studio randomizzato Remodl-B che prevedeva un confronto tra R-CHOP e R-CHOP + bortezomib nei pazienti classificati come non GCB in base ad analisi di gene *expression profiling*. Lo studio è stato condotto utilizzando la metodica di riferimento per la definizione della cellula d'origine su tessuto paraffinato<sup>(11)</sup> e ha adottato un disegno che consentiva l'inizio della terapia (R-CHOP) in attesa dell'esito della lettura della COO ma non ha permesso di evidenziare nessuna differenza in termini di PFS in nessuno dei sottotipi di DLBCL analizzati tra i due schemi utilizzati<sup>(54)</sup>.

L'ibrutinib, farmaco orale inibitore di BTK, attivo nel trattamento della B-LLC, del linfoma mantellare e del Morbo di Waldenstrom, è stato valutato anche nel trattamento di pazienti con DLBCL reci-

divato refrattario, in uno studio di fase II, e ha permesso di osservare una risposta nel 41% dei pazienti ABC con limitati benefici invece per i CGB (5% di CR)<sup>(55)</sup>. Questa osservazione è stata utilizzata per disegnare lo studio randomizzato PHOENIX, che confronta lo standard R-CHOP con il regime sperimentale R-CHOP + ibrutinib in pazienti con DLBCL di tipo ABC non precedentemente trattati (NCT01855750). I risultati sono attesi nel corso del 2018-19.

La lenalidomide, farmaco immunomodulatore attivo nella terapia del mieloma multiplo, del linfoma mantellare e del linfoma follicolare ha mostrato attività in monoterapia e in schemi di combinazione anche nel trattamento dei DLBCL<sup>(56)</sup>.

Recentemente sono stati pubblicati i risultati di due studi di fase II, uno italiano (REAL07) e l'altro guidato dal gruppo della Mayo Clinic, che hanno valutato la combinazione di R-CHOP con la Lenalidomide in paziente con DLBCL non precedentemente trattati. Entrambi gli studi hanno riportato un ottimo tasso di risposte (ORR 92% nel REAL 07 e 98% nello studio americano) con una PFS e OS dell'80% e 92% rispettivamente per il trial italiano e 59% e 78% in quello statunitense.

Nessuna differenza in PFS e OS con l'aggiunta della lenalidomide è stata registrata nei due sottogruppi molecolari ABC e GCB suggerendo che l'aggiunta del farmaco allo standard immunochemioterapico potrebbe consentire di migliorare l'efficacia di trattamenti per i pazienti con DLBCL non GCB<sup>(57,58)</sup>. Sulla base di questi risultati la Fondazione Italiana Linfomi ha avviato in collaborazione con i ricercatori della MAYO Clinic lo studio di fase III ROBUST, in cui è previsto un confronto randomizzato tra R2CHOP vs R-CHOP + placebo nei pazienti con DLBCL di tipo ABC (NCT02285062). Lo studio utilizza l'analisi *nanostripping* centralizzata su tessuto paraffinato per la definizione della COO e ha recentemente completato la fase di arruolamento.

L'attività di lenalidomide per i DLBCL unita al buon profilo di sicurezza del farmaco sono state utilizzate come razionale per analizzare l'efficacia di una terapia di mantenimento dopo R-CHOP. Lo studio randomizzato REMARC recentemente pubblicato ha valutato il ruolo del mantenimento con lenalidomide in 650 pazienti di età compresa fra i 60 e gli 80 anni in risposta completa o parziale dopo induzione con R-CHOP dimostrando un vantaggio significativo per PFS, obiettivo primario, rispetto al placebo (braccio di controllo). Il migliore controllo di malattia tuttavia non si è tradotto in un vantaggio in termini di OS probabilmente per l'intervento di cause di morte diverse dalla progressione del linfoma che sono tipiche e attese per una popolazione di pazienti anziani<sup>(59)</sup>.

### Ruolo di *cMyc*, *BCL2* e *BCL6*

Ad oggi rimane ancora non del tutto chiarito quale sia il migliore approccio terapeutico per ridurre il rischio associato alla presenza della doppia traslocazione cromosomica di *cMyc* e *BCL2* o *BCL6* e un trattamento standard per questi pazienti non è ancora stato in-

dividuato. Da uno studio retrospettivo su 106 pazienti di cui il 77% era rappresentato da casi *double hit* è emerso che l'impiego del regime R-DAEPOCH seguito da ASCT è associato a risposte complete in misura maggiore rispetto a R-CHOP ( $p=0,01$ )<sup>(60)</sup>. Howlett ha inoltre recentemente riportato i dati di una metanalisi di confronto fra R-CHOP, DA-EPOCH-R e regimi intensificati come R-Hyper-CVAD and R-CODOX-M/IVAC) mostrando un vantaggio in termini di PFS per i pazienti trattati con DA-EPOCH R<sup>(61)</sup>. Infine, i risultati preliminari di uno studio di fase II condotto su pazienti con linfoma B aggressivo e con traslocazione di cMYC, hanno mostrato un beneficio sia in PFS che TTP e OS per il regime DA-EPOCH R<sup>(28)</sup>.

L'ottenimento di una risposta completa con la prima linea tramite l'impiego di regimi intensificati è associato a un prolungamento della PFS e dell'OS anche in pazienti Myc positivi o in presenza di una concomitante traslocazione BCL2<sup>(62)</sup>.

In conclusione, in base ai dati disponibili e dagli studi randomizzati già completati ad oggi non è possibile sostenere l'utilità di trattamenti basati sulla definizione della cellula d'origine e lo schema R-CHOP 21 rimane ancora lo standard. L'attesa pubblicazione dei risultati degli studi randomizzati per i casi DLBCL ABC potrebbe modificare l'approccio alla terapia di questi pazienti in un prossimo futuro. Fanno già eccezione i casi di DLBCL identificati come *double hit* per cui è sufficientemente dimostrato che l'utilizzo di R-CHOP non consente di ottenere risultati soddisfacenti e per i quali sono piuttosto consigliati schemi infusionali come R-DA-EPOCH, schemi più intensificati derivati dalla terapia dei linfomi di Burkitt.

## Terapia di salvataggio

Circa il 10-15% dei pazienti affetti da DLBCL presenta una malattia refrattaria al trattamento (mancata risposta o recidiva entro i primi 3 mesi dalla prima linea), una percentuale pari circa al 25% invece recidiva dopo una prima risposta all'induzione. Il tempo alla recidiva e la durata della risposta alla prima linea sono fattori prognostici importanti da tenere in considerazione per predire la sopravvivenza del paziente recidivato<sup>(63)</sup>. Oltre al tempo alla recidiva altri fattori ricoprono un ruolo prognosticamente significativo: l'IPI alla recidiva/progressione<sup>(64)</sup> e la risposta alla malattia valutata tramite PET pre-trapianto<sup>(65, 66)</sup>.

Storicamente il trattamento ad alte dosi seguito da supporto di cellule staminali autologhe ha rappresentato nei pazienti eleggibili per età e performance status e con malattia chemiosensibile la migliore chance di cura (PARMA TRIAL). Per la reinduzione della risposta pre trapianto sono stati presi in considerazione diversi schemi di trattamento ma al momento nessuno si è mostrato superiore rispetto agli altri. Lo studio CORAL ha confrontato lo schema R-DHAP (rituximab, desametasone, ara-C e cisplatino) e R-ICE (rituximab, ifosfamide, carboplatino, etoposide) prima del consolidamento ad alte dosi senza mettere in luce differenze né in termini di PFS che di

OS<sup>(63)</sup>. Risultati analoghi sono emersi anche dallo studio LY12 del gruppo canadese che ha confrontato lo schema R-GDP (rituximab, gemcitabina, cisplatino e desametasone) con R-DHAP<sup>(67)</sup>.

Entrambi gli studi hanno inoltre valutato l'efficacia di un trattamento di rituximab di mantenimento post-ASCT rispetto all'osservazione ma con esito negativo.

Quale osservazione di rilievo emersa in particolare dall'analisi dello studio CORAL è stato l'impatto negativo sulla sopravvivenza del breve tempo alla recidiva e dell'uso di rituximab nella terapia di prima linea. Questa seconda osservazione suggerisce che terapie efficaci di prima linea selezionano recidive più aggressive, solleva alcuni dubbi sulla reale efficacia dell'intensificazione nell'era dell'immunochimioterapia e rafforza il concetto per cui l'obiettivo principale della gestione di un paziente con DLBCL debba essere l'ottenimento della remissione completa con la prima linea di terapia.

Nei pazienti non candidabili al trapianto la bendamustina in combinazione con rituximab (BR) ha consentito di ottenere risultati incoraggianti in diversi studi<sup>(68, 47)</sup>. In questo scenario il farmaco pixantrone si è dimostrato una buona opzione per i pazienti che non abbiano risposto ad almeno due precedenti linee di trattamento sulla base dei risultati dello studio di fase III PIX301 che ne ha testato l'efficacia e il profilo di tollerabilità in monoterapia in 97 pazienti recidivati mostrando una buona risposta al trattamento<sup>(69)</sup> anche in pazienti precedentemente trattati con antracicline.

Fra i nuovi farmaci di cui si è già discusso per la terapia di prima linea può essere preso in considerazione l'utilizzo di lenalidomide che utilizzata in mono-terapia o in combinazione con rituximab consente di ottenere una durata mediana di risposta di 6,2 mesi nei pazienti con profilo ABC *vs* 1,7 mesi nei GCB ( $p=0,004$ )<sup>(56)</sup>.

La combinazione di lenalidomide e immunoterapia è risultata efficace e ben tollerata anche nei pazienti più anziani<sup>(69)</sup>.

Infine trattando di pazienti con DLBCL recidivato refrattario vanno citati i dati recentemente pubblicati di uno studio multicentrico di fase II che ha valutato in 111 pazienti con malattia recidivata o refrattario il ruolo dell'acicabtagene ciloleucel, nell'ambito delle terapie con CAR T cell (*chimeric antigen receptor*). Il trattamento ha permesso di ottenere risposte complessivamente nel 82% dei casi trattati con un tasso di risposte complete del 54% dei casi. Dopo un follow up mediano di 15 mesi, il 40% dei pazienti ha mantenuto la risposta completa e ha mostrato un buona tolleranza al farmaco<sup>(70)</sup>. Sulla base dello studio, FDA ne ha approvato l'utilizzo negli USA per i pazienti con DLBCL recidivato refrattario dopo almeno due linee di trattamento.

## Profilassi del sistema nervoso centrale

Il rischio di recidiva al sistema nervoso centrale (SNC) per i pazienti con DLBCL si è notevolmente ridotto nell'era del rituximab e si presenta oggi con un rischio stimabile al 5% circa dei casi per i quali rappresenta una complicanza devastante con un impatto importante

sulla sopravvivenza che è di soli 2-5 mesi dall'evento <sup>(71,72)</sup>. La maggior parte delle recidive al SNC si verifica solitamente prima di quelle sistemiche, entro un anno dalla diagnosi di DLBCL e con coinvolgimento del parenchima cerebrale; più rare sono le localizzazioni leptomeningee. I problemi maggiori per la trattazione delle recidive al SNC riguardano la definizione del rischio e la possibilità di prevenire l'evento nei soggetti ad alto rischio.

Il CNS-IPI è stato recentemente proposto come strumento prognostico per individuare i pazienti a più alto rischio di recidiva al SNC. L'indice considera oltre ai già noti fattori dell'IPI anche il coinvolgimento di sedi extranodali come il rene, il surrene e il testicolo; il modello permette di stratificare i pazienti in 3 diversi gruppi di rischio: basso (0-1 fattore, rischio a 2 anni 0,6%), intermedio (2-3 fattori, percentuale di rischio a 2 anni 3,4%) e alto (4-6 fattori con correlato rischio a 2 anni del 10,2%) <sup>(73)</sup>. CNS-IPI rappresenta lo strumento oggi più efficace per la definizione del rischio di recidiva al SNC.

Alla valutazione clinico strumentale va aggiunta l'osservazione che il rischio di recidiva al SNC non è omogeneo tra i diversi sottotipi di DLBCL. In particolare rispetto ai casi GCB, utilizzati come riferimento, il rischio di recidiva al SNC incrementa nei casi classificati come ABC ed è influenzato in maniera significativa dalla presenza di doppia espressione di MYC e BCL-2 in IHC <sup>(74)</sup> o nei casi *double hit* <sup>(71)</sup>. In conclusione quindi una valutazione del rischio di recidiva al SNC andrebbe sempre fatta al momento della diagnosi di DLBCL utilizzando accertamenti diretti (prelievo di liquor e/o TAC encefalo) nei pazienti a maggiore rischio (CNS-IPI >3, *double expressor* e casi *double hit*). Il riscontro di malattia al SNC al momento della diagnosi impone la scelta di schemi di trattamento utilizzati per i linfomi primitivi cerebrali, diversi da R-CHOP <sup>(75)</sup>.

Nei casi ad alto rischio in cui non è presente interessamento del SNC alla diagnosi può essere utile utilizzare terapie per la profilassi delle recidive al SNC. Ampiamente utilizzata è la somministrazione di

Studio	Pazienti (n) età	Trattamento	PFS	OS	Valore p (PFS e OS) LNH03-2B GELA
Recher et al, 2011	379 18-60 anni	R-CHOP21 VS R-ACVBP	3-year PFS 73% vs 87%	3-year OS 84% vs 92%	0,002 0,007
Cunningham et al, 2013	1080 ≥ 18 anni	R-CHOP21 VS R-CHOP14	2-year PFS 75% vs 75%	2-year OS 81% vs 83%	0,590 0,376
Delarue et al, 2013	602 60-80 anni	R-CHOP21 VS R-CHOP14	3-year PFS 62% vs 60%	3-year OS 72% vs 69%	0,898 0,748
DSHNHL -2002-1, Schmitz et al, 2012	275 18-60 anni	R-CHOEP14 VS R-Mega-CHOEP	3-year PFS 74% vs 70%	3-year OS 85% vs 77%	0,48 0,08
SWOG- 9704, Stiff et al, 2013	253 15-65 anni	(R)-CHOPx8 VS(R)CHOPx6+ASCT	2-year PFS 56% vs 69%	2-year OS 71% vs 74%	0,006 0,30
GITIL RHDS Cortelazzo et al, JCO 2016	235 18-65 anni	R-CHOP 14 VS R-HDS+ ASCT	3-year PFS 65% vs 75%	3-year OS 74% vs 77%	0,119 0,64
CALGB/Alliance 50303 Wilson et al, Blood 2016	524 ≥ 18 anni	R-CHOP 21 VS DA-EPOCH-R	5-year EFS 69% vs 66%	5-year OS 80% vs	0,44 0,42
Chiappella et al, Lancet 2017	399 18-65 anni	R-HDT+ ASCT VS R-dose dense	2-year PFS 72% vs 65%	5-year OS 78% vs 77%	0,064 0,91

PFS = progression free survival; OS = overall survival; EFS = event-free-survival; R-CHOP = rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, prednisone; R-ACVBP = rituximab, doxorubicina, ciclofosfamide, vindesina, bleomicina, prednisone; R-CHOEP 14 = rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, etoposide, prednisone; R-MegaCHOEP = R-CHOEP con dose escalata di ciclofosfamide, etoposide e doxorubicina; DA-EPOCH-R = rituximab, etoposide, doxorubicina, vincristina, ciclofosfamide, prednisone; RHDS = rituximab high dose sequential therapy.

Tabella 1 - Risultati dei principali studi che hanno valutato alternative al regime R-CHOP per il trattamento degli stadi avanzati.

metotrexate IT (IT MTX) al dosaggio di 12 mg settimanale per 4 somministrazioni al giorno 1 dei primi 4 cicli di terapia<sup>(18,26)</sup>. Tuttavia dai dati estratti dallo studio RICOVER 60 e da un'analisi su uno studio di popolazione statunitense<sup>(76)</sup> sono emersi risultati controversi circa la reale efficacia dell'uso di IT MTX.

Anche la citarabina convenzionale o la formulazione liposomiale per uso intratecale e il rituximab si sono dimostrati attivi nel controllo della malattia leptomeningea ma al momento non vi sono dati per raccomandarne l'utilizzo nei pazienti con finalità profilattica<sup>(77)</sup>.

In alternativa alla terapia intratecale i pazienti con un buon *performance status* possono ricevere un trattamento di profilassi per via sistemica utilizzando il farmaco metotrexate a dosi intermedio-alte. La dose somministrata di MTX endovena varia da 1,5 a 3,5 g/m<sup>2</sup><sup>(78,79)</sup> e il trattamento è generalmente somministrato per 2 cicli in coda al trattamento R-CHOP o anticipando la prima somministrazione subito dopo il primo o il secondo ciclo R-CHOP. La scelta del tipo di profilassi da utilizzare non è supportata da studi randomizzati ma l'utilizzo di una modalità di trattamento deve essere sempre discusso con il paziente in presenza di fattori di rischio.

## Bibliografia

1. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, et al. Comparison of a Standard Regimen (CHOP) with Three Intensive Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 1993;328(14):1002-6.
2. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van Der Lelie H, Bron D, et al. Autologous Bone Marrow Transplantation as Compared with Salvage Chemotherapy in Relapses of Chemotherapy-Sensitive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 1995;333(23):1540-5.
3. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepage G, Plantier I, Castaigne S, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood.* 2010;116(12):2040-5.
4. Habermann TM, Weller EA, Morrison VA, Gascoyne RD, Cassileth PA, Cohn JB, et al. Rituximab-CHOP Versus CHOP Alone or With Maintenance Rituximab in Older Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(19):3121-7.
5. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood.* 2015;125(1):22-32.
6. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 1993;329(14):987-94.
7. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood.* 2007;109(5):1857-61.
8. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood.* 2014;123(6):837-42.
9. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: The Lugano classification. *J Clin Oncol.* 2014;32(27):3059-67.
10. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol.* 2015;33(26):2848-56.
11. Barrans S, Crouch S, Smith A, Turner K, Owen R, Patmore R, et al. Rearrangement of MYC Is Associated With Poor Prognosis in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated in the Era of Rituximab. *J Clin Oncol.* 2010;28(20):3360-5.
12. Pfreundschuh M, Trümper L, Österborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):379-91.
13. Held G, Murawski N, Ziepert M, Fleckenstein J, Pöschel V, Zwick C, et al. Role of radiotherapy to bulky disease in elderly patients with aggressive B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2014;32(11):1112-8.
14. Pfreundschuh M, Christofyllakis K. Radiotherapy to bulky disease PET-negative after immunochemotherapy in elderly DLBCL patients: Results of a planned interim analysis of the first 187 patients with bulky disease treated in the OPTIMAL>60 study of the DSHNHL. *J Clin Oncol.* 2017;35(15\_suppl):7506.
15. Pfreundschuh M, Schubert J, Ziepert M, Schmits R, Mohren M, Lengfelder E, et al. Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol.* 2008;9(2):105-16.
16. Delarue R, Tilly H, Mounier N, Petrella T, Salles G, Thieblemont C, et al. Dose-dense rituximab-CHOP compared with standard rituximab-CHOP in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (the LNH03-6B study): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):525-33.

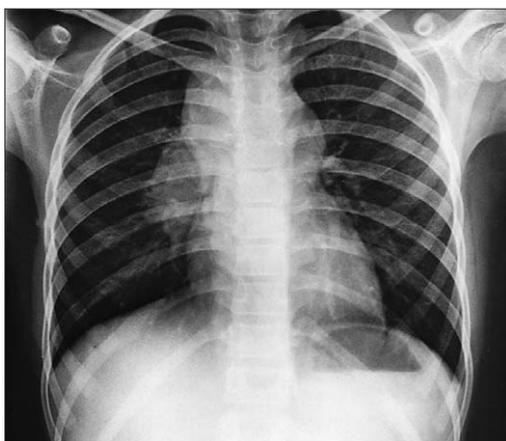
## Conclusioni

Il trattamento dei pazienti con DLBCL si basa oggi sull'utilizzo della combinazione R-CHOP 21 che si è confermato come l'indiscusso standard di trattamento di prima linea per la maggior parte dei pazienti. Fanno eccezione i soli pazienti anziani in cui è possibile utilizzare una versione meno tossica dello standard (R-mini-CHOP) o trattamenti senza antracicline e i pazienti con DLBCL double hit in cui l'aggressività biologica e clinica della malattia impone l'utilizzo di schemi intensivi diversi da R-CHOP.

Il risultato ottenuto nei pazienti con DLBCL sono buoni ma sono ancora gravati da un numero elevato di fallimenti. Un miglioramento potrebbe derivare dall'utilizzo dei nuovi farmaci ma i primi studi hanno dato esito negativo. Una nuova generazione di studi randomizzati sta attualmente sviluppando l'ipotesi che il miglioramento della terapia per i DLBCL possa essere ottenuto utilizzando i nuovi farmaci in maniera più razionale selezionando per tempo il paziente più adatto a trarre vantaggio dall'azione della nuova molecola, nell'ottica di un concetto di medicina personalizzata o di precisione.

17. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet*. 2013;381(9880):1817-26.
18. Récher C, Coiffier B, Haioun C, Molina TJ, Fermé C, Casasnovas O, et al. Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2011;378(9806):1858-67.
19. André M, Mounier N, Leleu X, Sonet A, Brice P, Henry-Amar M, et al. Second cancers and late toxicities after treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma with the ACVBP regimen: a GELA cohort study on 2837 patients. *Blood*. 2004;103(4):1222-8.
20. Tarella C, Zanni M, Di Nicola M, Patti C, Calvi R, Pescarollo A, et al. Prolonged survival in poor-risk diffuse large B-cell lymphoma following front-line treatment with rituximab-supplemented, early-intensified chemotherapy with multiple autologous hematopoietic stem cell support: a multicenter study by GITIL (Gruppo Italiano). *Leukemia*. 2007;21(8):1802-11.
21. Vitolo U, Chiappella A, Angelucci E, Rossi G, Liberati AM, Cabras MG, et al. Dose-dense and high-dose chemotherapy plus rituximab with autologous stem cell transplantation for primary treatment of diffuse large B-cell lymphoma with a poor prognosis: a phase II multicenter study. *Haematologica*. 2009;94(9):1250-8.
22. Schmitz N, Nickelsen M, Ziepert M, Haenel M, Borchmann P, Schmidt C, et al. Conventional chemotherapy (CHOEP-14) with rituximab or high-dose chemotherapy (MegaCHOEP) with rituximab for young, high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma: an open-label, randomised, phase 3 trial (DSHNHL 2002-1). *Lancet Oncol*. 2012;13(12):1250-9.
23. Stiff PJ, Unger JM, Cook JR, Constine LS, Couban S, Stewart DA, et al. Autologous Transplantation as Consolidation for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;369(18):1681-90.
24. Cortelazzo S, Tarella C, Gianni AM, Ladetto M, Barbui AM, Rossi A, et al. Randomized Trial Comparing R-CHOP Versus High-Dose Sequential Chemotherapy in High-Risk Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *J Clin Oncol*. 2016;34(33):4015-22.
25. Chiappella A, Martelli M, Angelucci E, Brusamolino E, Evangelista A, Carella AM, et al. Rituximab-dose-dense chemotherapy with or without high-dose chemotherapy plus autologous stem-cell transplantation in high-risk diffuse large B-cell lymphoma (DLCL04): final results of a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2017;18(8):1076-88.
26. Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hegde U, Grant N, Steinberg SM, et al. Phase II Study of Dose-Adjusted EPOCH and Rituximab in Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma With Analysis of Germinal Center and Post-Germinal Center Biomarkers. *J Clin Oncol*. 2008;26(16):2717-24.
27. Wilson WH, Jung S-H, Porcu P, Hurd D, Johnson J, Martin SE, et al. A Cancer and Leukemia Group B multi-center study of DA-EPOCH-rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of outcome by molecular subtype. *Haematologica*. 2012;97(5):758-65.
28. Dunleavy K, Fanale M, LaCasce A, Noy A, Caimi P, Parekh S, et al. Preliminary Report of a Multicenter Prospective Phase II Study of DA-EPOCH-R in MYC-Rearranged Aggressive B-Cell Lymphoma. *Blood*. 2014;124(21):395.
29. Wilson WH, Sin-Ho J, Pitcher BN, Hsi ED, Friedberg J, Cheson B, et al. Phase III Randomized Study of R-CHOP Versus DA-EPOCH-R and Molecular Analysis of Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma: CALGB/Alliance 50303. *Blood*. 2016;128(22):469 LP-469.
30. Herter S, Herting F, Mundigl O, Waldhauer I, Weinzierl T, Fauti T, et al. Preclinical activity of the type II CD20 antibody GA101 (obinutuzumab) compared with rituximab and ofatumumab in vitro and in xenograft models. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(10):2031-42.
31. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370(12):1101-10.
32. Marcus R, Davies A, Ando K, Klapper W, Opat S, Owen C, et al. Obinutuzumab for the First-Line Treatment of Follicular Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(14):1331-44.
33. Vitolo U, Trněný M, Belada D, Burke JM, Carella AM, Chua N, et al. Obinutuzumab or Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Previously Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(31):3529-37.
34. Lugtenburg P, Avivi I, Berenschot H, Ilhan O, Marolleau JP, Nagler A, et al. Efficacy and safety of subcutaneous and intravenous rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in first-line diffuse large B-cell lymphoma: the randomized MabEase study. *Haematologica*. 2017;102(11):1913-22.
35. Candelaria M, Gonzalez DE, Beniwal SK, Dasappa L, Bar DO, Delamain MT, et al. A Randomized, Double-Blind, Phase III Study Comparing Proposed Biosimilar Rituximab (RTXM83) Versus Reference Rituximab, Both in Combination with CHOP, in the First Line Treatment of Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL). *Blood*. 2017;130(Suppl 1):1556.
36. Kim WS, Buske C, Ogura M, Jurczak W, Sancho J-M, Zhavrid E, et al. Efficacy, pharmacokinetics, and safety of the biosimilar CT-P10 compared with rituximab in patients with previously untreated advanced-stage follicular lymphoma: a randomised, double-blind, parallel-group, non-inferiority phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2017;4(8):e362-73.
37. Jurczak W, Moreira I, Kanakasetty GB, Munhoz E, Echeveste MA, Giri P, et al. Rituximab biosimilar and reference rituximab in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma (ASSIST-FL): primary results from a confirmatory phase 3, double-blind, randomised, controlled study. *Lancet Haematol*. 2017;4(8):e350-61.
38. van de Schans SA, Wymenga AN, van Spronsen DJ, Schouten HC, Coebergh JW, Janssen-Heijnen ML. Two sides of the medallion: poor treatment tolerance but better survival by standard chemotherapy in elderly patients with advanced-stage diffuse large B-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2012;23(5):1280-6.
39. Mareschal S, Lanic H, Ruminy P, Bastard C, Tilly H, Jardin F. The proportion of activated B-cell like subtype among de novo diffuse large B-cell lymphoma increases with age. *Haematologica*. 2011;96(12):1888-90.
40. Williams JN, Rai A, Lipscomb J, Koff JL, Nastoupil LJ, Flowers CR. Disease characteristics, patterns of care, and survival in very elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer*. 2015;121(11):1800-8.
41. Peyrade F, Jardin F, Thieblemont C, Thyss A, Emile J-F, Castaigne S, et al. Attenuated immunochemotherapy regimen (R-miniCHOP) in elderly patients older than 80 years with diffuse large B-cell lymphoma: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(5):460-8.
42. Luminari S, Montanini A, Caballero D, Bologna S, Natter M, Dyer MJS, et al. Nonpegylated liposomal doxorubicin (Myocet™) combination (R-COMP) chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): results from the phase II EUR018 trial. *Ann Oncol*. 2010;21(7):1492-9.
43. Luminari S, Viel E, Ferreri AJM, Zaja F, Chimienti E, Musuraca G, et al. Non-pegylated liposomal doxorubicin combination regimen in patients with diffuse large B-cell lymphoma and cardiac comorbidity. Results of the HEART01 phase II trial conducted by the Fondazione Italiana Linfomi. *Hematol Oncol*. 2018;36(1):68-75.
44. Moccia AA, Schaff K, Hoskins P, Klasa R, Savage KJ, Shenkier T, et al. R-CHOP with Etoposide Substituted for Doxorubicin (R-CEOP): Excellent Outcome in Diffuse Large B Cell Lymphoma for Patients with a Contraindication to Anthracyclines. *ASH Annu Meet Abstr* 2009 114. 2009.
45. Rashidi A, Oak E, Carson KR, Wagner-Johnston ND, Kreisel F, Bartlett NL. Outcomes with R-CEOP for R-CHOP-ineligible patients with diffuse large B-cell lymphoma are highly dependent on cell of origin defined by Hans criteria. *Leuk Lymphoma*. 2016;57(5):1191-3.
46. Weidmann E, Kim S-Z, Rost A, Schuppert H, Seipelt G, Hoelder D, et al. Bendamustine is effective in relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2002;13(8):1285-9.

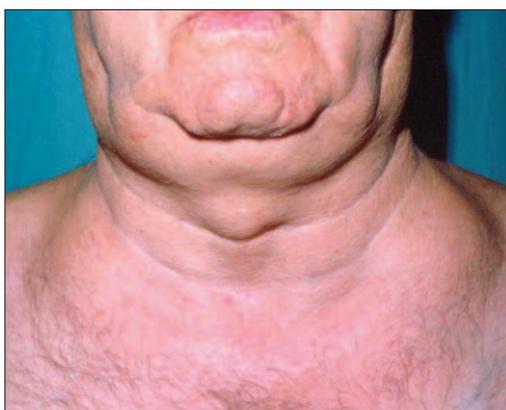
47. Ohmachi K, Niitsu N, Uchida T, Kim SJ, Ando K, Takahashi N, et al. Multicenter phase II study of bendamustine plus rituximab in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2013;31(17):2103-9.
48. Park SI, Grover NS, Olajide O, Asch AS, Wall JG, Richards KL, et al. A phase II trial of bendamustine in combination with rituximab in older patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2016;175(2):281-9.
49. Peyrade F, Bologna S, Delwail V, Emile JF, Pascal L, Fermé C, et al. Combination of ofatumumab and reduced-dose CHOP for diffuse large B-cell lymphomas in patients aged 80 years or older: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial from the LYSA group. *Lancet Haematol.* 2017;4(1):e46-55.
50. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375-90.
51. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346(25):1937-47.
52. Friedberg JW. How I treat double-hit lymphoma. *Blood.* 2017;130(5):590-6.
53. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical Double-Hit Score Is a Strong Predictor of Outcome in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J Clin Oncol.* 2012; 30(28):3460-7.
54. Davies AJ, Barrans S, Maishman T, Cummin TE, Bentley M, Mamot C, et al. Differential Efficacy of Bortezomib in Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBL): A Prospective Randomised Study Stratified by Transcriptome Profiling: Remodl-B. *Hematol Oncol.* 2017;35:130-1.
55. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med.* 2015;21(8):922-6.
56. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Deeb G, Zinzani PL, Pileri SA, Malik F, Macon WR, et al. Higher response to lenalidomide in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer.* 2011;117(22):5058-66.
57. Vitolo U, Chiappella A, Franceschetti S, Carella AM, Baldi I, Inghirami G, et al. Lenalidomide plus R-CHOP21 in elderly patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: results of the REAL07 open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(7):730-7.
58. Nowakowski GS, LaPlant B, Macon WR, Reeder CB, Foran JM, Nelson GD, et al. Lenalidomide combined with R-CHOP overcomes negative prognostic impact of non-germinal center B-cell phenotype in newly diagnosed diffuse large B-Cell lymphoma: a phase II study. *J Clin Oncol.* 2015;33(3):251-7.
59. Thieblemont C, Tilly H, Gomes da Silva M, Casasnovas R-O, Fruchart C, Morschhauser F, et al. Lenalidomide Maintenance Compared With Placebo in Responding Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With First-Line Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J Clin Oncol.* 2017;35(22):2473-81.
60. Petrich AM, Gandhi M, Jovanovic B, Castillo JJ, Rajguru S, Yang DT, et al. Impact of induction regimen and stem cell transplantation on outcomes in double-hit lymphoma: a multicenter retrospective analysis. *Blood.* 2014;124(15):2354-61.
61. Howlett C, Snedecor SJ, Landsburg DJ, Svoboda J, Chong EA, Schuster SJ, et al. Front-line, dose-escalated immunochemotherapy is associated with a significant progression-free survival advantage in patients with double-hit lymphomas: a systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol.* 2015;170(4):504-14.
62. Cohen JB, Geyer SM, Lozanski G, Zhao W, Heerema NA, Hall NC, et al. Complete response to induction therapy in patients with Myc-positive and double-hit non-Hodgkin lymphoma is associated with prolonged progression-free survival. *Cancer.* 2014;120(11):1677-85.
63. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh Gill D, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol.* 2010;28(27):4184-90.
64. Hamlin PA, Zelenetz AD, Kewalramani T, Qin J, Satagopan JM, Verbel D, et al. Age-adjusted International Prognostic Index predicts autologous stem cell transplantation outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2003;102(6):1989-96.
65. Hoppe BS, Moskowitz CH, Zhang Z, Maragulia JC, Rice RD, Reiner AS, et al. The role of FDG-PET imaging and involved field radiotherapy in relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43(12):941-8.
66. Caballero MD, Pérez-Simón JA, Iriondo A, Lahuerta JJ, Sierra J, Marín J, et al. High-dose therapy in diffuse large cell lymphoma: results and prognostic factors in 452 patients from the GEL-TAMO Spanish Cooperative Group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2003;14(1):140-51.
67. Crump M, Kuruvilla J, Couban S, MacDonald DA, Kukreti V, Kouroukis CT, et al. Randomized comparison of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin versus dexamethasone, cytarabine, and cisplatin chemotherapy before autologous stem-cell transplantation for relapsed and refractory aggressive lymphomas: NCIC-CTG LY.12. *J Clin Oncol.* 2014;32(31):3490-6.
68. Vacirca JL, Acs PI, Tabbara IA, Rosen PJ, Lee P, Lynam E. Bendamustine combined with rituximab for patients with relapsed or refractory diffuse large B cell lymphoma. *Ann Hematol.* 2014;93(3):403-9.
69. Pettengell R, Sebban C, Zinzani PL, Derigs HG, Kravchenko S, Singer JW, et al. Monotherapy with pixantrone in histologically confirmed relapsed or refractory aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma: post-hoc analyses from a phase III trial. *Br J Haematol.* 2016;174(5):692-9.
70. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2531-44.
71. Fletcher CD, Kahl BS. Central nervous system involvement in diffuse large B-cell lymphoma: an analysis of risks and prevention strategies in the post-rituximab era. *Leuk Lymphoma.* 2014;55(10):2228-40.
72. Gleeson M, Counsell N, Cunningham D, Chadwick N, Lawrie A, Hawkes EA, et al. Central nervous system relapse of diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: results of the UK NCRI R-CHOP-14 versus 21 trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017;28(10):2511-6.
73. Schmitz N, Zeynalova S, Nickelsen M, Kansara R, Villa D, Sehn LH, et al. CNS International Prognostic Index: A Risk Model for CNS Relapse in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With R-CHOP. *J Clin Oncol.* 2016;34(26):3150-6.
74. Savage KJ, Slack GW, Mottok A, Sehn LH, Villa D, Kansara R, et al. Impact of dual expression of MYC and BCL2 by immunohistochemistry on the risk of CNS relapse in DLBCL. *Blood.* 2016;127(18):2182-8.
75. Ferreri AJM, Cwynarski K, Pulczynski E, Ponzoni M, Deckert M, Politi LS, et al. Chemoimmunotherapy with methotrexate, cytarabine, thiotepa, and rituximab (MATRix regimen) in patients with primary CNS lymphoma: results of the first randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 (IELSG32) phase 2 trial. *Lancet Haematol.* 2016;3(5):e217-27.
76. Kumar A, Vanderplas A, LaCasce AS, Rodriguez MA, Crosby AL, Lepisto E, et al. Lack of benefit of central nervous system prophylaxis for diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era: findings from a large national database. *Cancer.* 2012;118(11):2944-51.
77. McMillan A, Ardeshtna KM, Cwynarski K, Lyttelton M, McKay P, Montoto S, et al. Guideline on the prevention of secondary central nervous system lymphoma: British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol.* 2013;163(2):168-81.
78. Abramson JS, Hellmann M, Barnes JA, Hammerman P, Toomey C, Takvorian T, et al. Intravenous methotrexate as central nervous system (CNS) prophylaxis is associated with a low risk of CNS recurrence in high-risk patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer.* 2010;116(18):4283-90.
79. Holte H, Leppä S, Björkholm M, Fluge O, Jyrkkio S, Delabie J, et al. Dose-densified chemoimmunotherapy followed by systemic central nervous system prophylaxis for younger high-risk diffuse large B-cell/follicular grade 3 lymphoma patients: results of a phase II Nordic Lymphoma Group study. *Ann Oncol.* 2013;24(5):1385-92.



*DLBCL: localizzazione mediastinica  
(Archivio di G. Lambertenghi Delilieri)*



*DLBCL: localizzazione cavo ascellare  
(Archivio di G. Lambertenghi Delilieri)*



*DLBCL: localizzazione cervicale e sottoclaveare  
(Archivio di G. Lambertenghi Delilieri)*



*DLBCL: localizzazione cutanea  
(Archivio di G. Lambertenghi Delilieri)*

---

### **Parole Chiave**

Linfoma a grandi cellule, linfoma non Hodgking, terapia.

---

### **Indirizzi per la corrispondenza**

*Stefano Luminari*

Programma di Ricerca Clinica Oncoematologica  
S.C. Ematologia, Arcispedale S. Maria Nuova-IRCCS  
Professore Associato di Oncologia, Università di Modena e Reggio Emilia  
V.le Risorgimento 80, 42123 Reggio Emilia - Italy  
tel: 0522.296119  
fax: 0522.296694  
luminari.stefano@ausl.re.it  
sluminari@unimore.it

# Clinica e terapia in età pediatrica



Marta Pillon, Davide Massano, Elisa Carraro

Clinica di Oncoematologia Pediatrica, Dipartimento di Pediatria, Azienda Ospedaliera-Università di Padova

## Introduzione

Il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) rappresenta circa il 10-20% dei linfomi non Hodgkin (LNH) a cellule B dell'età pediatrica e si manifesta più frequentemente negli adolescenti<sup>(1-4)</sup>. I miglioramenti nella stadiazione clinica e una maggiore conoscenza della modalità di diffusione, insieme ai progressi della chemioterapia e della terapia di supporto, hanno contribuito a migliorare notevolmente la sopravvivenza dei bambini ed adolescenti con DLBCL. Negli ultimi 30 anni, la sopravvivenza a 5 anni di tutti i bambini con LNH, considerati nel loro insieme, è migliorata dal 30% all'80%<sup>(1, 2, 5, 6)</sup>. In particolare, con l'utilizzo degli stessi protocolli terapeutici, si è ottenuta la stessa sopravvivenza sia per i pazienti affetti da DLBCL che per i pazienti con linfoma di Burkitt (BL)<sup>(2, 7, 8)</sup>. In alcune forme localizzate (stadio I e II), la sopravvivenza del DLBCL pediatrico ha raggiunto circa il 95% a 5 anni<sup>(1-4, 7-10)</sup>.

## Epidemiologia

Ci sono poche informazioni epidemiologiche disponibili sul DLBCL in età pediatrica. Secondo i dati del SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*), l'incidenza annuale media dei DLBCL negli Stati Uniti tra il 1977-1995 per pazienti di età compresa tra 0-19 anni era 9 casi per milione. Di questi, meno del 10% erano bambini di età <5 anni. Più del 60% dei casi erano pazienti con età ≥15 anni. L'incidenza dei DLBCL sembra essere rimasta stabile nel periodo 1975-1995 in pazienti di età <15 anni, mentre c'è stato un aumento di incidenza nei pazienti di età compresa tra 15-19 anni, passando da 10,7 per milione nel periodo 1975-1979 a 16,3 per milione nel periodo 1990-1995<sup>(5)</sup>. C'è una leggera predominanza del sesso maschile nel DLBCL, con un rapporto maschio/femmina di 1,4:1,0 negli Stati Uniti. Il DLBCL e BL sono i sottotipi più comuni di LNH che sono stati osservati associati a sindromi da immunodeficienza congenita o acquisita<sup>(11-13)</sup>. A differenza del

BL o del linfoma linfoblastico, non sembrano esserci marcate differenze in termini di incidenza tra le varie regioni del mondo<sup>(14)</sup>.

## Caratteristiche istologiche e citogenetiche

Analogamente alle forme dell'adulto, i DLBCL dell'età pediatrica vengono classificati sulla base della classificazione WHO dei tumori ematopoietici e dei tessuti linfoidei<sup>(15)</sup>. Le forme di più frequente riscontro sono: (i) il DLBCL non altrimenti specificato (DLBCL, NAS); (ii) il linfoma a grandi cellule B primitivo del mediastino (PMLBCL); e (iii) i linfomi B di alto grado non altrimenti specificati e *double hit* (HGBL, NAS e HGBL, DH).

Le caratteristiche morfologiche del DLBCL NAS pediatrico sono sostanzialmente sovrapponibili a quelle delle forme dell'adulto (es. blasti di grande taglia con *pattern* di crescita diffuso, variabilmente associati ad aree di necrosi e ad istiociti con aspetti del tipo "a cielo stellato").

Sotto il profilo fenotipico, i DLBCL pediatrici hanno indice proliferativo più elevato e risultano più frequentemente positivi per MYC, CD10 e BCL6 rispetto alle forme dell'adulto.<sup>(6, 16)</sup> Tale profilo giustifica la netta prevalenza di forme GCB (*germinal center B cell-like*), con rapporto GCB:ABC (*activated B cell-like*) variabile da 3:1 a 5:1<sup>(6, 17, 18)</sup>. Diversamente dall'adulto, la stratificazione GCB vs ABC non sembra avere un impatto prognostico, con ottime curve di sopravvivenza per entrambe le forme<sup>(17)</sup>.

Sotto il profilo citogenetico, i DLBCL NAS dell'età pediatrica dimostrano frequenti aberrazioni coinvolgenti l'oncogene MYC (i.e. traslocazioni e/o amplificazioni del locus 8q24)<sup>(19)</sup> e occasionali alterazioni del gene BCL6.<sup>(18, 20-24)</sup> Queste ultime sono di più comune riscontro in pazienti di età adolescenziale o adulta. Eccezionali sono invece le alterazioni coinvolgenti il gene BCL2 e linfomi *double hit* con traslocazioni coinvolgenti i geni BCL2 e MYC.<sup>(6)</sup>

Le caratteristiche istologiche e fenotipiche del PMLBCL dell'età pediatrica sono sovrapponibili a quelle dell'adulto. Per la loro trattazione si rimanda al paragrafo relativo ai PMLBCL.

## Stadiazione e inquadramento diagnostico

Un'accurata stadiazione è di importanza fondamentale per una terapia ottimale. Numerosi sistemi di stadiazione sono stati usati per i LNH pediatrici nel tempo. Poiché la maggior parte dei pazienti con DLBCL si presenta con malattia extranodale in stadio avanzato, il sistema di stadiazione *Ann Arbor*, usato comunemente per i pazienti adulti, non è risultato pratico per i pazienti pediatrici. La stadiazione del *St. Jude Children's Research Hospital*, descritta da Murphy nel 1980,<sup>(25)</sup> è quella attualmente utilizzata per la classificazione dei LNH pediatrici. Essa prende in considerazione le sedi comunemente coinvolte nel LNH pediatrico, cioè il coinvolgimento extranodale, la diffusione metastatica al midollo osseo (MO) e al sistema nervoso centrale (SNC) e l'interessamento di sedi non contigue. Tuttavia, la stadiazione *St. Jude* non definisce chiaramente l'estensione della malattia primaria, soprattutto nel caso questa venga asportata completamente alla diagnosi. Per meglio definire lo stadio dei pazienti pediatrici con LNH, in particolare della linea B, è stata successivamente proposta una nuova classificazione, detta FAB-LMB (*French-American-British/Lymphomas Malins B*), utilizzata dal CCG (*Children's Cancer Group*) americano, dal UKCCSG (*United Kingdom Children's Cancer Study Group*) e dal gruppo di studio SFOP (*Société Française d'Oncologie Pédiatrique*)<sup>(7, 26, 27)</sup>. Questa è simile alla *St. Jude* ma include l'*outcome* della chirurgia nei gruppi A, B e C. Altre caratteristiche prognostiche usate per stratificare la terapia includono la lattico deidrogenasi (LDH), la rapida risposta alle terapie, e la sede primaria di malattia, come nella classificazione in gruppi di rischio utilizzata dal gruppo tedesco BFM (*Berlin-Frankfurt-Münster*)<sup>(8, 9)</sup>.

I progressi avvenuti negli ultimi 30 anni nel campo della diagnostica dei LNH pediatrici, soprattutto nella caratterizzazione citogenetica, molecolare, ed immunofenotipica, nonché lo sviluppo di nuove metodiche diagnostiche per la determinazione della malattia minima disseminata (MMD) o residua, e il maggior utilizzo di tecniche radiologiche di ultima generazione, hanno messo in evidenza alcune limitazioni della stadiazione *St. Jude*.<sup>(28-34)</sup> Un gruppo internazionale di esperti, riuniti nel 2009 a Francoforte, durante il 3<sup>rd</sup> *International Symposium on Childhood, Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin's Lymphoma*, hanno sviluppato e proposto un nuovo sistema di stadiazione internazionale, chiamato IPNHLSS (*International Paediatric NHL Staging System*), con l'obiettivo di superare le limitazioni della stadiazione in uso. Tra le maggiori limitazioni della stadiazione *St. Jude* venivano rilevate la mancanza di considerazione per nuove distinte entità istologiche di LNH, l'assenza di riconoscimento di alcune sedi come cute, osso, rene, ovaio, o altri organi interessati, e

la mancanza dei più recenti e precisi metodi per determinare l'interessamento del MO e del SNC, la quantificazione della MMD e l'assenza delle più recenti tecniche diagnostiche. Nella IPNHLSS, gli Autori riconoscevano infatti il ruolo prognostico di alcune specifiche caratteristiche di malattia, inclusa la MMD, e suggerivano nuove tecniche per la quantificazione della MMD nel MO e nel liquido cerebro-spinale per alcuni sottotipi istologici di LNH<sup>(35)</sup>.

La IPNHLSS potrebbe permettere in futuro la stratificazione dei pazienti in base alla MMD, al fine di potenziare la terapia per i pazienti ad alto rischio e ridurre la tossicità per i pazienti a basso rischio<sup>(36)</sup> (Tabella 1 e 2).

Gli esami diagnostici standard per i bambini affetti da LNH che vengono eseguiti seguono le indicazioni date dai protocolli terapeutici pediatrici dei maggiori gruppi di studio internazionali, ad esempio del gruppo americano COG (*Children Oncology Group*), del FAB/LMB, del BFM, o derivati da questi<sup>(1, 3, 4, 9, 26, 37)</sup>.

La procedura più importante per confermare la diagnosi di LNH è la biopsia del tessuto tumorale o il campionamento delle cellule tumorali (liquido pleurico, liquido cefalorachidiano, MO) per esami istologici e/o citologici, caratterizzazione immunofenotipica, studi citogenetici e di biologia molecolare. Una volta posta la diagnosi istologica il *work up* diagnostico, strutturato per studiare la malattia secondo i criteri di Murphy,<sup>(25)</sup> prevede la valutazione delle localizzazioni midollari ed a carico del SNC, mediante biopsia osteomidollare bilaterale, e l'esame del liquido cefalorachidiano dopo rachicentesi esplorativa.

Per quanto riguarda invece lo studio delle possibili sedi anatomiche interessate dalla proliferazione neoplastica, la metodica più utilizzata è la tomografia computerizzata (TC) che consente un'adeguata definizione dell'estensione tumorale e dei suoi margini soprattutto per lo studio delle localizzazioni toraciche ed addomino-pelviche. La risonanza magnetica nucleare (RMN) è impiegata nello studio del SNC e del midollo spinale, o nel sospetto di localizzazione dello scheletro e del distretto testa-collo. L'ecografia ha un ruolo marginale nella fase di stadiazione, ma può essere utile per monitorare la risposta al trattamento chemioterapico in fase iniziale, soprattutto per il controllo delle stazioni linfonodali superficiali, dei testicoli e dell'addome. Il ruolo della Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) con Fluoro-desossi-glucosio (18F-FDG) associata a TC nel *management* dei LNH dell'età pediatrica deve essere ancora stabilito.

L'esame PET-FDG potrebbe essere più accurato nel definire le sedi di malattia rispetto alla diagnostica convenzionale grazie all'elevato *uptake* di FDG proprio delle cellule linfomatose. L'impatto della PET-FDG sulla stratificazione del rischio e il conseguente trattamento chemioterapico non sono stati valutati in studi clinici controllati in ambito pediatrico, e il ruolo della PET-FDG nella valutazione della remissione di malattia è stato studiato soltanto in casistiche limitate<sup>(38-42)</sup>. A completamento della valutazione pre-trattamento andranno valutati il *performance status*, la funzionalità cardiaca e la frazione d'eiezione;

	Sistema di Stadiazione secondo St. Jude <sup>(25)</sup>	Sistema di Stadiazione secondo IPNHLSS <sup>(36)</sup>
<b>Stadio I</b>	Un singolo linfonodo interessato o una singola localizzazione extranodale senza diffusione locale. Sono escluse le localizzazioni mediastiniche, addominali ed epidurali.	Un singolo tumore, ad esclusione di mediastino e addome (N; EN; O o C: EN-O, EN-C). #
<b>Stadio II</b>	Due o più regioni linfonodali e/o localizzazioni extranodali dallo stesso lato del diaframma. Sono escluse le localizzazioni addominali ampie non resecabili, mediastiniche ed epidurali.	Un singolo tumore EN con interessamento dei linfonodi regionali. ≥ Due aree N dallo stesso lato del diaframma. Tumore primitivo del tratto gastrointestinale (solitamente nell'area ileocecale), ± il coinvolgimento dei linfonodi mesenterici associati, completamente resecabile (se vi è presenza di ascite maligna o estensione del tumore agli organi adiacenti dovrebbe essere considerato come stadio III).#
<b>Stadio III</b>	Due o più regioni linfonodali o extranodali da entrambi i lati del diaframma. Tutti le manifestazioni toraciche (mediastino, polmone, timo, pleura). Tutte le manifestazioni ampie e non resecabili addominali. Tutte le localizzazioni epidurali, indipendentemente da altri sedi interessate.	≥ Due tumori EN (inclusi EN-O o EN-C) sopra e/o sotto il diaframma. ≥ Due aree N sopra e sotto il diaframma. Qualsiasi tumore intratoracico (mediastino, ilo, polmone, pleura o timo). Malattia intra-addominale e retroperitoneale, incluso fegato, milza, reni, e/o ovaie indipendentemente dal livello di resezione (eccetto il tumore primitivo del tratto gastrointestinale [solitamente nell'area ileocecale], ± il coinvolgimento dei linfonodi mesenterici associati, completamente resecabile). Qualsiasi tumore paraspinale o epidurale, indipendentemente da altre sedi coinvolte. Singola lesione ossea con coinvolgimento di sedi EN e/o N non regionali. #
<b>Stadio IV</b>	Ognuno degli stadi precedenti con coinvolgimento del sistema nervoso centrale (SNC) o del midollo osseo (MO).*	Ognuno degli stadi precedenti con iniziale coinvolgimento del SNC (stadio IV SNC) o del MO (stadio IV MO), o entrambi basati sui metodi diagnostici convenzionali.#

\* In caso di impegno del MO, la percentuale dei blasti deve essere < 25% perché la malattia sia classificata come LNH in stadio IV; se la percentuale è ≥25% la malattia è classificata come leucemia linfoblastica acuta B o T o L3.  
# Per ogni stadio, il tipo di studio diagnostico e livello di coinvolgimento del MO e SNC deve essere specificato. Basata sulla classificazione proposta da Murphy.  
Abbreviazioni: O, osso; MO, midollo osseo; EN, extranodale; N, nodale; C, cute.

Tabella 1 - Sistema di stadiazione per il LNH pediatrico secondo St. Jude vs sistema di stadiazione internazionale (IPNHLSS) <sup>(25,36)</sup>.

	NHL-BFM 95/AIEOP LNH-97	SFOP/CCG/UKCCSGPOG	Stadio I
Malattia localizzata	R1 Stadio I e II completamente resecato.	A Stadio I completamente resecato. Stadio II addominale completamente resecato.	Stadio I-II
Malattia disseminata	R2 Stadio I e II non completamente resecato. Stadio III con LDH <500 UI/L. R3 Stadio III con LDH 500-1000 UI/L. Stadio IV con LDH <1000 UI/L. R4 Stadio IV con LDH ≥1000 UI/L +/- coinvolgimento SNC.	B Tutti gli stadi esclusi dal gruppo A e C. C Coinvolgimento SNC Coinvolgimento MO	Stadio III-IV

Legenda: LDH: latticodeidrogenasi; SNC: sistema nervoso centrale; MO: midollo osseo.

Tabella 2 - Classificazione dei gruppi di rischio secondo diversi Gruppi di Studio internazionali <sup>(37)</sup>.

andranno eseguiti studi della funzionalità epato-renale, assetto emocoagulativo e stabiliti i livelli di acido urico, albumina e di LDH. In tutti i pazienti con nuova diagnosi di LNH-B sono indicati anche uno studio immunitario di base, nonché il test per il virus dell'immunodeficienza umana e la ricerca dell'*Epstein Barr* virus<sup>(11-13, 38)</sup>.

## Caratteristiche cliniche

La presentazione clinica dei LNH in età pediatrica differisce da quella osservata nell'adulto, presentandosi frequentemente all'esordio con malattia a sede extranodale e con rarissima diffusione al MO e al SNC<sup>(1, 3, 37)</sup>. Per anni non è stato facile stabilire l'esatta incidenza delle sedi primarie del DLBCL nel bambino e nell'adolescente, in quanto molte casistiche pediatriche hanno descritto le caratteristiche cliniche dei DLBCL con gli ALCL (linfoma anaplastico a grandi cellule) o con altri LNH-B (soprattutto BL e PMLBCL)<sup>(8, 9, 43)</sup>. Altre casistiche, soprattutto americane, riportavano inoltre casistiche miste pediatriche ed adulte rendendo quindi complicata l'estrapolazione dei dati relativi all'età pediatrica<sup>(44)</sup>. Una grossa casistica di 244 pazienti pediatrici con DLBCL, pubblicata nel 2008 dal gruppo BFM, ha mostrato che la maggior parte dei DLBCL pediatrici si presenta in stadio I e II, mentre il 41% dei pazienti si presenta in stadio III e solo il 4% in stadio IV, di cui 1% con coinvolgimento del MO e il 3% del SNC<sup>(3)</sup>. I rari casi di pazienti con interessamento SNC all'esordio, si manifestano soprattutto con masse intra-parenchimali piuttosto che con interessamento delle meningi<sup>(45)</sup>, e si presentano quindi all'esordio con sintomi da compressione spinale, paralisi dei nervi cranici e/o periferici, e/o convulsioni che richiedono un immediato intervento medico<sup>(1, 14)</sup>.

La presentazione in stadio IV risulta essere più frequente invece nei BL, presente nel 28% dei 924 BL pediatrici analizzati nello stesso periodo di tempo, con prevalente coinvolgimento del MO (25% dei casi) rispetto al SNC (10% dei casi)<sup>(3)</sup>. I pazienti pediatrici con DLBCL hanno un'età mediana alla diagnosi maggiore rispetto ai BL (11,4; range 1,4-17,9 vs 8,6; range 0,7-19,2) e si presentano frequen-

temente con malattia localizzata a livello addominale, con lesioni focali a livello del fegato (6%), milza (6%), reni (4%), meno comunemente con malattia a livello mediastinico (14%), polmonare (5%), o osseo (8%). Meno frequente è la diffusione ai tessuti molli (3%) o alla cute (1%), come pure l'ascite (6%), il versamento pleurico (3%), o il versamento pericardico (3%)<sup>(1, 3)</sup>. Rispetto ai BL, nei DLBCL il valore di LDH risulta  $\geq 500$  UI/L solo nel 14% dei casi, come pure nel 14% dei casi vengono riferiti alla diagnosi i sintomi B (febbre  $> 38$  °C e/o perdita di peso  $> 10\%$  del peso corporeo e/o sudorazione notturna) associati alla malattia<sup>(3)</sup>. La presentazione clinica dipende sia dalle sedi di coinvolgimento sia dall'estensione della malattia. Il DLBCL in stadio localizzato si può presentare con adenopatia palpabile senza sintomi sistemici associati; quelli con sede primaria addominale possono presentarsi con sanguinamento gastrointestinale, invaginazione, o addome acuto, simulando un'appendicite, sebbene la presentazione con l'invaginazione ileo-cecale sia tipica del BL a sede addominale<sup>(44)</sup>. Così pure la sede mediastinica può dare sintomatologia respiratoria e può accompagnarsi alla sindrome della vena cava superiore, richiedendo la diagnosi differenziale con il PMLBCL. Le forme diffuse si accompagnano più spesso a sintomi sistemici B. Nella casistica pubblicata dal gruppo americano POG (*Pediatric Oncology Group*) nel 2005, infatti, i sintomi B erano presenti nel 36% dei pazienti pediatrici con DLBCL in stadio III e IV (75 casi) e il 76% dei pazienti in questo gruppo aveva un elevato valore di LDH<sup>(43)</sup>.

Una analisi di recente pubblicazione condotta dall'Associazione Italiana di Oncoematologia Pediatrica (AIEOP) su 63 pazienti pediatrici con DLBCL, ha confermato la modalità di presentazione descritta dal gruppo tedesco, sottolineando in particolare il rarissimo coinvolgimento del MO e del SNC, e la frequente localizzazione addominale (20%), linfonodale laterocervicale (16%), evidenziando inoltre il coinvolgimento di tonsille o rinofaringe (rispettivamente 16% e 5% dei casi), osseo (8%), e sedi multiple (35%)<sup>(37)</sup> (Figura 1A, 1B).

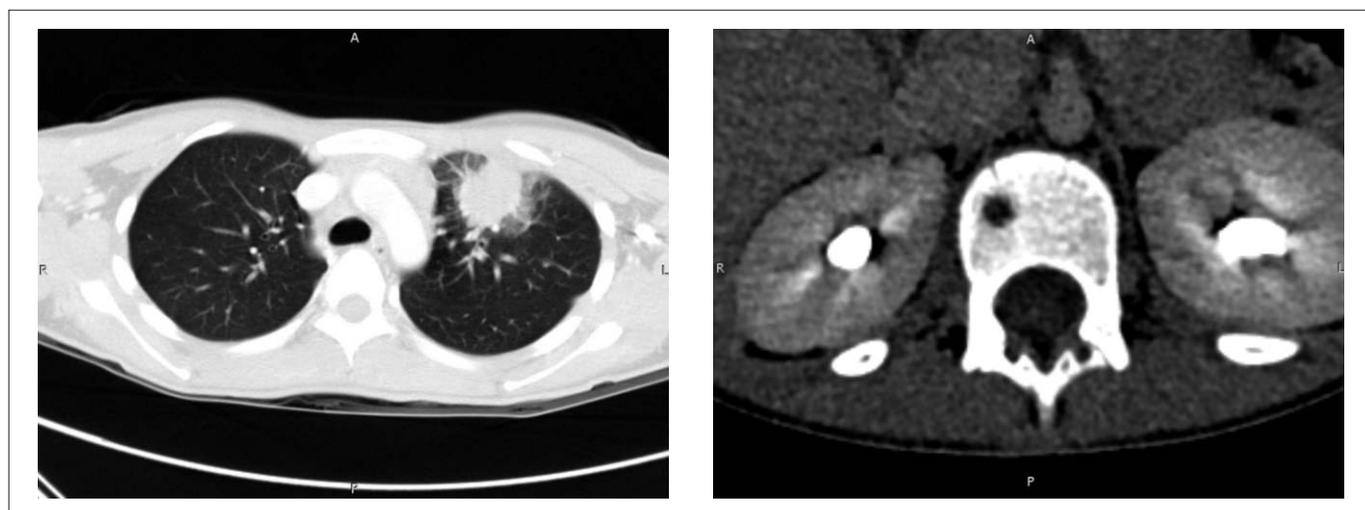


Figura 1 - Immagine TAC di localizzazione polmonare di DLBCL (1A) e di localizzazione vertebrale di DLBCL primitivo dell'osso (1B).

Il basso numero di pazienti con DLBCL riportato nella maggior parte delle casistiche pediatriche pubblicate non permette, purtroppo, di stabilire in modo univoco se i diversi sottotipi istologici di DLBCL abbiano presentazioni cliniche diverse<sup>(44)</sup>. Soltanto l'ampia casistica presentata dal gruppo BFM sui 244 pazienti pediatrici con DLBCL, riporta dati sulla presentazione clinica dei diversi sottotipi istologici di DLBCL. I dati relativi alla presentazione clinica dei pazienti con la variante centroblastica (186 casi) sono per la maggior parte sovrapponibili a quelli descritti per tutto il gruppo di 244 pazienti, rappresentando il 76% dei casi di DLBCL. Interessante invece sottolineare che soltanto i pazienti con la variante immunoblastica, e quelli con la variante ricca in istiociti/cellule T, possono avere un maggior coinvolgimento del MO e del SNC alla diagnosi, o presentarsi con una massa mediastinica, rispettivamente nel 23% e 25% dei casi<sup>(3)</sup>. L'esiguità dei numeri non ha permesso però di eseguire delle analisi statistiche di associazione tra istologia e presentazione clinica alla diagnosi. Soltanto uno studio sul profilo di espressione genica condotto sempre dal gruppo BFM su 134 pazienti pediatrici con DLBCL, arruolati nel periodo 1990-1998 nei due consecutivi trials NHL-BFM90 e NHL-BFM95, è riuscito a dimostrare che non ci sono differenze statisticamente significative nella presentazione clinica tra il sottogruppo GCB, predominante in età pediatrica, e il sottogruppo non-GCB<sup>(17)</sup>.

Una descrizione a parte merita il DLBCL primitivo dell'osso che è un'entità relativamente rara tra i DLBCL pediatrici, mostrando invece il suo picco d'incidenza nella quinta decade di vita prevalentemente nel sesso maschile<sup>(46, 47)</sup>. In passato, il linfoma primitivo dell'osso è stato riportato nel 5% dei LNH e nel 7% dei tumori primitivi dell'osso<sup>(47)</sup>. La presentazione clinica del linfoma primitivo dell'osso può essere sovrapponibile a quella di altri tumori primitivi dell'osso, come ad esempio il Sarcoma di Ewing, manifestandosi con dolore osseo localizzato talvolta accompagnato da una massa palpabile. Gli esami radiologici eseguiti all'esordio non sono da soli dirimenti ai fini diagnostici, mostrando spesso una lesione osteolitica alla radiografia o simulando un tumore primitivo dell'osso alla RMN. Circa la metà delle lesioni interessano le ossa lunghe, mentre nel 25% dei casi interessano le ossa della pelvi e le vertebre.

Il POG ha pubblicato nel 1999 una casistica di 31 pazienti pediatrici (5% dei LNH analizzati nel periodo 1983-1997), in basso stadio, con localizzazione soprattutto alle ossa lunghe degli arti inferiori.

Il DLBCL non era descritto però come un'entità distinta<sup>(46)</sup>. Il CCG pure ha riportato 31 casi di linfoma primitivo dell'osso, pari al 2% dei pazienti arruolati negli studi del CCG tra il 1977 e il 1996.<sup>(47)</sup> Casistiche più recenti riportano un'incidenza di circa 8% di localizzazione ossea tra i DLBCL pediatrici<sup>(3)</sup>. In genere, i pazienti con linfoma primitivo dell'osso sono stati trattati in passato e tuttora vengono curati bene con la stessa terapia utilizzata per altri LNH, appropriata per stadio e istologia<sup>(3, 37, 46, 47)</sup>.

Nella diagnosi differenziale del DLBCL, oltre al BL e al tumore primitivo dell'osso, bisogna ricordare il PMLBCL la cui presentazione clinica in età pediatrica è stata ampiamente descritta negli ultimi anni,<sup>(2, 3, 9, 48-51)</sup> soprattutto da quando le nuove classificazioni istopatologiche hanno riconosciuto tale entità istologicamente e geneticamente distinta dal DLBCL (vedi paragrafo PMLBCL).

La localizzazione mediastinica isolata non è sufficiente a suggerire la diagnosi di PMLBCL, che origina dalla cellula B di origine timica, in quanto altri sottotipi di DLBCL si possono presentare con linfonodi mediastinici ma senza l'interessamento timico.<sup>(44)</sup> Nella diagnosi differenziale bisogna anche considerare il BL a sede mediastinica, che presenta una prognosi significativamente inferiore rispetto ai BL con altra sede di malattia<sup>(52, 53)</sup>.

## Principi generali di terapia

### Chemioterapia

I pazienti pediatrici e adolescenti affetti da DLBCL vengono attualmente trattati con gli stessi schemi terapeutici riservati ai pazienti con BL che si basano su una strategia polichemioterapica stratificata secondo gruppi di rischio. In questa patologia, la chirurgia ha solo un ruolo diagnostico o utile alla rivalutazione della malattia. L'*outcome* dei pazienti con DLBCL non è diverso da quello dei pazienti con BL, anche se le ricadute nel DLBCL possono manifestarsi anche a distanza di tempo. Il sottotipo istologico, infatti, non è stato dimostrato essere un fattore prognostico sfavorevole in numerosi studi internazionali<sup>(2, 6)</sup>. Un'eccezione deve però essere fatta per i PMLBCL, istologia piuttosto rara nei bambini, in cui è stata dimostrata una prognosi peggiore (vedi paragrafo PMLBCL)<sup>(48)</sup>.

Nel corso delle ultime decadi la terapia per il DLBCL ha permesso di ottenere sostanziali miglioramenti in termini di EFS (*Event Free Survival*). Negli Stati Uniti, i dati SEER hanno mostrato significativi miglioramenti nella sopravvivenza dei pazienti di 0-19 anni con LNH: negli anni 1975-2000, la sopravvivenza è migliorata dal 42,1% al 78,5% nei maschi e dal 57,9% al 82,4% nelle femmine<sup>(5)</sup>. In alcuni gruppi terapeutici le cure hanno permesso di ottenere il 100% di sopravvivenza, come riportato dai diversi gruppi di studio<sup>(1-3, 6)</sup>. Gli schemi terapeutici attuali prevedono una stratificazione del trattamento in gruppi di rischio, definiti in base ad alcune caratteristiche cliniche e patologiche, volta a ottimizzare le cure ma anche a ridurre gli effetti collaterali dei chemioterapici specialmente per i pazienti con malattia localizzata. A questo scopo sono stati utilizzati blocchi terapeutici ad alta intensità ma di breve durata, è stata ridotta la profilassi del SNC, ed è stata abolita la radioterapia (RT) craniale. La strategia terapeutica di molti gruppi di studio, inclusi BFM, SFOP, AIEOP, UKCCSG, e CCG, pertanto, è stata quella di raggruppare i DLBCL con altri LNH a cellule B mature e di trattare i pazienti con lo stesso schema, in base al gruppo di rischio assegnato. Sebbene la definizione del gruppo di rischio sia leggermente diversa,

la strategia complessiva è basata sull'estensione della malattia alla diagnosi e sul valore di LDH <sup>(2, 6)</sup>.

Il POG, gruppo americano che nel 2000 si unì al CCG dando inizio alla più grande organizzazione mondiale per la cura del cancro pediatrico, il COG, aveva invece scelto un altro approccio terapeutico per i DLBCL, raggruppandoli per istologia con altri LNH a grandi cellule come ad esempio gli ALCL, strategia in seguito abbandonata in base ai migliori risultati terapeutici ottenuti dagli altri gruppi di studio <sup>(1, 3)</sup>. La Tabella 3 riporta un confronto tra i principali protocolli utilizzati.

### Stadio localizzato di malattia

I bambini e adolescenti affetti da DLBCL con malattia localizzata, trattati con i cicli brevi e intensi, hanno mostrato un ottimo *outcome* nei diversi protocolli. Nei gruppi di studio BFM, SFOP e POG/ CCG i cicli terapeutici per i pazienti a basso rischio erano comunemente basati sull'utilizzo di farmaci come ciclofosfamide e metotrexate (MTX) somministrati in un arco di tempo di alcune settimane <sup>(1-3, 6)</sup>. Nello studio francese LMB89, i pazienti nel

gruppo a basso rischio A (52 pazienti), trattati con 2 cicli COPAD (ciclofosfamide, vincristina, prednisone, e doxorubicina), e senza chemioterapia intratecale, mostrarono una OS (*Overall Survival*) e una EFS a 5 anni rispettivamente del 100% e del 98% <sup>(7)</sup>.

Lo studio FAB/LMB96, derivato dal protocollo LMB89, fu disegnato per confermare l'efficacia di questo approccio terapeutico (2 cicli COPAD, senza terapia intratecale) in un più ampio numero di pazienti con malattia localizzata completamente resecata. Lo studio FAB/ LMB96 coinvolse 3 gruppi internazionali (SFOP, COG, e UKCCSG) e arruolò pazienti con LNH-B in tutti gli stadi. I risultati relativi ai pazienti in stadio I o stadio II addominale completamente resecato, appartenenti al gruppo terapeutico A, mostrarono una OS e una EFS a 4 anni rispettivamente del 99,2% e del 98,3%, confermando quindi su ampia scala (132 pazienti) i risultati del protocollo LMB89 <sup>(54)</sup>.

Il gruppo tedesco, con lo studio NHL-BFM90, analizzò 71 pazienti assegnati al gruppo terapeutico a basso rischio (gruppo R1), ottenendo una EFS a 6 anni del 100%. Questi pazienti furono trattati

Protocollo	Durata	Doxorubicina	HD-MTX	Etoposide	Ifosfamide	Profilassi SNC
POG-CHOP <sup>(10)</sup>	9 sett.	120 mg/m <sup>2</sup>	NA	NA	NA	MTX/Ara-C/HC
POG - APO <sup>(43)</sup>	1 sett.	300 mg/m <sup>2</sup>	NA	NA	NA	MTX x6
LMB89 - Gruppo A <sup>(7)</sup>	6 sett.	120 mg/m <sup>2</sup>	NA	NA	NA	NA
LMB89 - Gruppo B <sup>(7)</sup>	12 sett.	120 mg/m <sup>2</sup>	3 g/m <sup>2</sup> x5	NA	NA	MTX/HC x8; Ara-C/HC x2
LMB89 - Gruppo C <sup>(7)</sup>	20 sett.	240 mg/m <sup>2</sup>	8 g/m <sup>2</sup> x3	2.5 g/m <sup>2</sup>	NA	MTX/Ara-C/HC x10
BFM95 - Gruppo R1 <sup>(9)</sup>	4-6 sett.	50 mg/m <sup>2</sup>	1 g/m <sup>2</sup> x2	0.2 g/m <sup>2</sup>	4 g/m <sup>2</sup>	MTX/Ara-C/PDN x2
NHL-BFM95 - Gruppo R2 <sup>(9)</sup>	9-13 sett.	100 mg/m <sup>2</sup>	1 g/m <sup>2</sup> x4	0.4 g/m <sup>2</sup>	8 g/m <sup>2</sup>	MTX/Ara-C/PDN x5
NHL-BFM 95 - Gruppo R3 <sup>(9)</sup>	11-16 sett.	100 mg/m <sup>2</sup>	5 g/m <sup>2</sup> x4	0.9 g/m <sup>2</sup>	8 g/m <sup>2</sup>	MTX/Ara-C/PDN x10
NHL-BFM 95 - Gruppo R4 <sup>(9)</sup>	13-19 sett.	100 mg/m <sup>2</sup>	5 g/m <sup>2</sup> x4	1.4 g/m <sup>2</sup>	8 g/m <sup>2</sup>	MTX/Ara-C/PDN x11
FAB/LMB96 - Gruppo A <sup>(26)</sup>	6 sett.	120 mg/m <sup>2</sup>	NA	NA	NA	NA
FAB/LMB96 - Gruppo B <sup>(26)</sup>	10 sett.	120 mg/m <sup>2</sup>	3 g/m <sup>2</sup> x5	NA	NA	MTX/HC x8; Ara-C/HC x2
FAB/LMB96 - Gruppo C <sup>(26)</sup>	20 sett.	240 mg/m <sup>2</sup>	8 g/m <sup>2</sup> x3	2.5 g/m <sup>2</sup>	NA	MTX/Ara-C/HC x10
Inter B-NHL ritux 2010 Gruppo B*	12-16 sett.	120 mg/m <sup>2</sup>	3 g/m <sup>2</sup> x4	NA	NA	MTX/HC x7; Ara-C/HC x2
Inter B-NHL ritux 2010 Gruppo C1*	16-20 sett.	180 mg/m <sup>2</sup>	8 g/m <sup>2</sup> X 3/4	2.05 g/m <sup>2</sup>	NA	MTX/Ara-C/HC x10/12
Inter B-NHL ritux 2010 Gruppo C3*	16-20 sett.	180 mg/m <sup>2</sup>	8 g/m <sup>2</sup> X 4	2.05 g/m <sup>2</sup>	NA	MTX/HC x2; MTX/AraC/HC x12

NA: non applicabile; sett.: settimane; HD: alte dosi; MTX: metotrexate; Ara-C: citarabina; HC: idrocortisone; PDN: prednisone; SNC: sistema nervoso centrale.

\* Clinicaltrials.gov identifier: NCT01516580

Tabella 3 - Descrizione dei principali protocolli terapeutici utilizzati nel DLBCL pediatrico.

con una prefase citoriduttiva seguita da 2 cicli di polichemioterapia in cui il MTX era somministrato a 500 mg/m<sup>2</sup> in 24 ore<sup>(8)</sup>.

Lo studio successivo, NHL-BFM95, inserì delle modifiche nel gruppo R1 (48 pazienti), eliminando la prefase citoriduttiva e modificando la dose e la durata di somministrazione del MTX eseguendo uno studio randomizzato (MTX 1 g/m<sup>2</sup> in infusione di 4 ore vs 24 ore). Si ottennero ugualmente eccellenti risultati in termini di EFS (94% a 3 anni), anche se l'infusione del MTX in 24 ore mostrava una FFS (*Failure Free Survival*) a 1 anno migliore rispetto all'infusione in 4 ore (100% vs 95%).<sup>(9)</sup> L'intervallo previsto tra i cicli era di circa 2 settimane, tale da mantenere l'alta dose-intensità della terapia anche per i pazienti in questa fascia di rischio e completare la terapia in tempi brevi (circa due mesi). La chemioterapia intratecale veniva somministrata ad ogni ciclo.

Anche il gruppo italiano AIEOP ha pubblicato ottimi risultati ottenuti nei pazienti pediatrici a basso rischio trattati nei due consecutivi protocolli nazionali AIEOP LNH-92 e AIEOP LNH-97, basati rispettivamente sui protocolli NHL-BFM90 e NHL-BFM95.<sup>(37, 55)</sup> Nel protocollo AIEOP LNH-92 i 13 pazienti in R1 mostrarono una EFS a 6 anni del 100%. Lo studio successivo, AIEOP LNH-97, confermò l'eccellente outcome per i 26 pazienti in R1 (19 BL e 7 DLBCL), mostrando una EFS a 5 anni del 100%<sup>(37)</sup>.

Anche lo studio POG 9219 riportò eccellenti risultati, con 98% di EFS a 5 anni in 46 pazienti con DLBCL in stadio I e II, trattati con 9 settimane di sola chemioterapia<sup>(44)</sup>. Il precedente studio del gruppo POG, infatti, era uno studio randomizzato che assegnava i pazienti con LNH (non veniva specificato quale sottotipo) in stadio precoce a ricevere chemioterapia (vincristina, ciclofosfamide, doxorubicina, prednisone, mercaptopurina e MTX) e RT (27 Gy) nelle sedi interessate alla diagnosi, o chemioterapia da sola. La conclusione di questo studio fu che la RT poteva essere omessa per questi pazienti senza ridurre la sopravvivenza. Questo studio dimostrò inoltre che 9 somministrazioni di terapia intratecale con MTX erano adeguate come profilassi del SNC per i bambini con LNH che originava dalla testa e dal collo e che per gli altri pazienti non era necessaria la profilassi intratecale. In uno studio successivo fu dimostrato che la sola terapia di induzione secondo lo schema CHOP (ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone) era sufficiente per ottenere la remissione completa (RC) continua e che il mantenimento non era necessario.<sup>(56)</sup> È difficile eseguire un esatto confronto tra i risultati di sopravvivenza pubblicati negli anni dai vari gruppi di studio internazionale, in quanto i gruppi di rischio sono stati definiti in maniera diversa nei gruppi SFOP/COG e BFM/BFM-like. In particolare lo stadio II è stato a volte incluso nel gruppo R1 e a volte nel gruppo R2 a seconda della resezione della massa iniziale.<sup>(8)</sup> Una importante considerazione nella scelta del miglior approccio terapeutico è optare per un trattamento che dia i migliori risultati ma con i minori effetti a lungo termine. Tra tutti gli studi citati, viene riportato solo un secondo

tumore in un paziente trattato nel gruppo a basso rischio del protocollo NHL-BFM95<sup>(9)</sup>.

### Stadio avanzato di malattia

La stratificazione delle terapie per i pazienti in stadio avanzato di malattia non è uniforme a causa delle diverse definizioni di gruppo di rischio adottate dai vari gruppi di studio negli anni. Sia il gruppo BFM che il gruppo SFOP, hanno tuttavia usato un approccio di stratificazione dei pazienti basato sull'estensione della malattia e sulla sua risposta precoce, aumentando dosi e durata delle terapie in base al rischio assegnato. Gli studi condotti dal gruppo tedesco e dal gruppo francese hanno permesso di raggiungere ottimi risultati in termini di OS, oltre il 90% e oltre l'80% per i pazienti in stadio avanzato, per i rispettivi gruppi di studio. Per tale motivo i protocolli BFM e i protocolli francesi, LMB, sono stati i più utilizzati nelle ultime decadi e quelli su cui ci concentreremo maggiormente nei prossimi paragrafi<sup>(1-3, 6)</sup>.

### Protocolli BFM

Lo studio NHL-BFM90,<sup>(8)</sup> condotto dal gruppo BFM dal 1990 al 1995 e che reclutò 413 pazienti eleggibili e valutabili per risposta, aveva come obiettivo quello di dimostrare se l'attribuzione del gruppo di rischio in base al valore di NHL e la rapida risposta alle terapie, oltre allo stadio, permetteva una migliore stratificazione dei pazienti nei diversi gruppi di rischio e un conseguente miglioramento della EFS rispetto allo studio NHL-BFM86<sup>(57)</sup>. Nello studio NHL-BFM90, i pazienti erano quindi suddivisi in 3 gruppi di rischio: R1, R2 e R3. Il gruppo R1 includeva pazienti con malattia completamente resecata (vedi sopra); il gruppo R2 includeva pazienti definiti a rischio intermedio, con resezione incompleta di una massa extra-addominale o con massa addominale e LDH <500 UI/L; il gruppo R3 comprendeva pazienti ad alto rischio con malattia addominale non resecata completamente e LDH ≥500 UI/L, tutti i casi con interessamento del MO e/o SNC e/o osseo multifocale. I pazienti in gruppo R2 venivano trattati con 4 cicli di terapia, basati su MTX ad alte dosi (5 gr/m<sup>2</sup> somministrato in 24 ore) associato ad altri chemioterapici, dopo una fase iniziale citoriduttiva basata su cortisone e ciclofosfamide. I pazienti in questo gruppo di rischio con una scarsa risposta alle terapie dopo il secondo ciclo di terapia, cioè con un residuo tumorale documentato radiologicamente, ricevevano un'intensificazione di terapia passando al gruppo R3. I pazienti assegnati alla diagnosi al gruppo R3 ricevevano, dopo una prefase citoriduttiva, 6 cicli di terapia ad alte dosi (identici a quelli previsti per R2). I pazienti nel gruppo R3 che dopo 2 cicli di chemioterapia presentavano persistenza di residuo tumorale, e/o persistenza di blasti nel MO e/o nel liquor, venivano avviati ad una intensificazione terapeutica sostituendo 2 dei cicli precedenti con 2 cicli basati su citarabina ad alte dosi. In caso di documentata persistenza di malattia dopo il terzo ciclo, il paziente veniva avviato ad intensificazione terapeutica con trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE)

autologhe midollari o periferiche. Nel trial NHL-BFM90, i pazienti assegnati al gruppo R2, definiti a rischio intermedio di malattia (n=167), avevano una EFS a 6 anni del 96%. Da notare che all'interno del gruppo R2, 46 pazienti (28%) avevano una massa residua dopo 2 cicli di terapia e venivano quindi avviati ad intensificazione terapeutica. In questo studio veniva proposto, quando possibile, il *second look* chirurgico in caso di incompleta risposta radiologica. Solo due dei 46 pazienti con un residuo tumorale dopo 2 cicli di terapia ebbero una progressione di malattia nonostante l'intensificazione della terapia. Una piccola percentuale di pazienti con risposta radiologica completa dopo 2 cicli di terapia, al contrario, ebbero una progressione nonostante una iniziale eccellente risposta alle terapie. Ne conseguiva che il riscontro di una massa residua alla prima rivalutazione di malattia non era predittiva di progressione di malattia. La procedura di *second look* chirurgico non veniva quindi più raccomandata per questo gruppo di rischio per il concreto rischio di complicanze anestesologiche e/o chirurgiche a cui poteva essere sottoposto il paziente. L'iniziale assegnazione del gruppo di rischio poteva invece predire il rischio di fallimento in modo più affidabile rispetto alla presenza della massa residua. La terapia più intensiva adottata nello studio NHL-BFM90 portò ad un significativo aumento della sopravvivenza rispetto al precedente protocollo NHL-BFM86, mostrando una EFS complessiva a 6 anni di 89% vs 82% (p=0,0087), e una EFS del 98% e 78% rispettivamente per i pazienti a rischio intermedio R2 e ad alto rischio R3. Un aumento della EFS a 6 anni si notò soprattutto per i 90 pazienti del gruppo R3 con malattia addominale in stadio III e con LDH  $\geq 500$  UI/L che migliorò dal 43% del trial NHL-BFM86 al 81% nel trial NHL-BFM95 (p=0,0001).<sup>(8,57)</sup> Per i pazienti del gruppo R3, un fattore predittivo di progressione di malattia nel trial NHL-BFM90 risultò essere il valore di LDH pre-trattamento  $\geq 1000$  UI/L. Questo parametro fu la base per l'ulteriore stratificazione del gruppo R3 del protocollo NHL-BFM90 in due nuovi gruppi di rischio R3 e R4 nel protocollo NHL-BFM95<sup>(9)</sup>. Complessivamente nello studio NHL-BFM90 erano stati trattati 56 pazienti con DLBCL, inclusi 8 con massa mediastinica, definiti a cellule B di origine timica. L'EFS a 6 anni non era significativamente diversa da quella di altri pazienti con altri sottotipi istologici e pari a 95%. A causa della scarsa numerosità dei casi, non erano disponibili dati sulla stratificazione per i DLBCL, in particolare non era noto quanti pazienti con DLBCL erano presenti in ciascun gruppo di rischio, o se la stratificazione portava effettivi vantaggi per questi pazienti.<sup>(8)</sup> Sulla base degli eccellenti risultati ottenuti dal protocollo NHL-BFM90, il trial NHL-BFM95 si focalizzò sullo studio randomizzato, condotto su 364 pazienti, che valutava l'efficacia del MTX, e la sua tossicità, in base alla dose somministrata e alla modalità di infusione<sup>(9)</sup>.

I pazienti vennero stratificati in 4 gruppi di rischio, in base alla resecabilità della massa, allo stadio, a LDH <500 UI/L o  $\geq 500$  e

<1000 UI/L o  $\geq 1000$  UI/L. I pazienti nel gruppo R3 ricevevano 5 cicli di terapia, mentre i pazienti nel gruppo R4 ricevevano 6 cicli di terapia. La scarsa risposta ai cicli iniziali era considerata un'indicazione ad ulteriore intensificazione di terapia con alte dosi di chemioterapia e *rescue* di cellule staminali autologhe. La citarabina ad alte dosi fu inserita nel nuovo piano terapeutico, sia nel gruppo R3 che R4. Nel gruppo R2, la dose del MTX era stata ridotta da 5 a 1 g/m<sup>2</sup> senza osservare una riduzione significativa dell'EFS. La EFS per i 222 pazienti del gruppo R2 del trial NHL-BFM95 (MTX a 1 g/m<sup>2</sup>) risultò infatti sovrapponibile a quella ottenuta per i 167 pazienti del gruppo R2 del trial NHL-BFM90 (MTX 5 g/m<sup>2</sup>), 94% vs 96% rispettivamente. La somministrazione del MTX in 4 ore fece registrare una riduzione della tossicità, soprattutto una significativa riduzione delle mucositi di III e IV grado, rispetto all'infusione in 24 ore. Questo si accompagnò però ad una minore efficacia del trattamento soprattutto nei gruppi R3 e R4 considerati insieme: FFS a un anno del 77% (n = 62) con MTX in 4 ore vs 93% (n = 69) con MTX in 24 ore (p=0,0077). Complessivamente però lo studio NHL-BFM95 mostrò ottimi risultati in termini di EFS a 3 anni anche per i gruppi R3 e R4 considerati complessivamente, e pari a 85% e a 81% rispettivamente. Per quanto riguarda i sottotipi istologici, esclusi i pazienti affetti da PMLBCL, anche nello studio NHL-BFM95 non si rilevò nessuna differenza nell'*outcome* tra BL (EFS a 3 anni del 93%) e DLBCL, in particolare per il gruppo di 81 pazienti con centroblastico (identica EFS a 3 anni del 93%). La conclusione dello studio NHL-BFM95 fu di non utilizzare il MTX in infusione di 4 ore per gli alti rischi di malattia<sup>(9)</sup>.

Recentemente il gruppo BFM ha condotto uno studio di fase 2 con una iniziale *window therapy*, con l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 (rituximab), della durata di 5 giorni prima dell'inizio del chemioterapia standard (studio BFM 04). Tra gli 87 pazienti pediatrici con LNH a cellule B, 36 risposero alla *window therapy* (*Response Rate* [RR] 41,4%). La risposta era definita come una riduzione < 25% di almeno una lesione o la scomparsa dei blasti nel MO o nel sangue periferico. Non risultò nessuna differenza tra la RR dei pazienti con BL (27 *responders* su 67 pazienti) e quelli con DLBCL (7 *responders* su 15 pazienti). Complessivamente lo studio dimostrò l'attività farmacologica del rituximab nel LNH-B pediatrico<sup>(58)</sup>.

#### Protocolli AIEOP

Come per gli altri gruppi di studio, anche nei protocolli disegnati dal gruppo italiano dell'AIEOP i pazienti pediatrici affetti da DLBCL ricevevano il medesimo trattamento riservato ai pazienti con BL. I protocolli AIEOP LNH-92<sup>(55)</sup> e AIEOP LNH-97<sup>(37)</sup> di derivazione BFM erano strutturati secondo gruppi di rischio stratificati per estensione di malattia e valore di LDH pre-trattamento. Il protocollo AIEOP LNH-92 prevedeva 3 gruppi di rischio e arruolò, dal 1992 al 1997, 144 bambini eleggibili e valutabili di età inferiore a 15 anni, di cui 28 con diagnosi di DLBCL. Con dati sovrapponi-

bili al protocollo NHL-BFM90,<sup>(8)</sup> la probabilità di EFS (*event free survival*) a 6 anni è stata del 86,9 e 75,1% per i gruppi R2 (n=54) e R3 (n=77), rispettivamente.

Recentemente il gruppo italiano ha pubblicato i risultati del successivo protocollo AIEOP LNH-97,<sup>(37)</sup> che prevedeva un trattamento stratificato in 4 gruppi di rischio, come nel protocollo NHL-BFM95<sup>(9)</sup>. Si trattava di uno studio non randomizzato, in cui il MTX veniva utilizzato in infusione di 24 ore, che arruolò 442 pazienti eleggibili e valutabili (379 BL e 63 DLBCL) dal 1997 al 2014.

Lo studio AIEOP LNH-97 ha riprodotto, anche in questo caso, risultati sovrapponibili al protocollo NHL-BFM95 sia in termini di OS che di EFS<sup>(37)</sup>. In questo studio sono stati confrontati i pazienti con DLBCL e con BL sia in termini di presentazione clinica che di sopravvivenza, escludendo dall'analisi i pazienti con PMLBCL, con nota prognosi sfavorevole<sup>(37, 48, 51)</sup>. In particolare, è stato possibile notare la diversa distribuzione dei pazienti con BL e DLBCL nei diversi gruppi di rischio: prevalenza dei BL nei gruppi R3 e R4 (58%) e prevalenza dei DLBCL nei gruppi di rischio R1 e R2 (62%).

Questo risultato era dovuto al minor coinvolgimento di MO e SNC e al più basso valore di LDH nei pazienti pediatrici con DLBCL rispetto ai pazienti con BL. Nonostante le differenze nella distribuzione, la prognosi nei due gruppi è risultata completamente sovrapponibile (EFS a 5 anni: BL 90% vs DLBCL 89%).

Sempre a 5 anni, la EFS è stata 96%, 90%, e 81%, rispettivamente per i pazienti R2, R3, e R4. La scarsa numerosità in questo studio dei pazienti con DLBCL non ha permesso un'analisi dettagliata della sopravvivenza per gruppo di rischio<sup>(37)</sup>.

#### Protocolli SFOP

Il trial LMB89, condotto dal gruppo francese SFOP dal 1989 al 1996, arruolò un totale di 561 pazienti pediatrici eleggibili per l'analisi, stratificati da un punto di vista terapeutico in 3 gruppi di rischio (A, B e C) basati esclusivamente sul coinvolgimento delle sedi di malattia alla diagnosi<sup>(7)</sup>. Rispetto ad altri gruppi internazionali, il valore di LDH non veniva considerato nell'assegnazione del gruppo di rischio. Il gruppo a rischio intermedio B, con 386 pazienti arruolati, prevedeva una prefase citoriduttiva (COP: prednisone, ciclofosfamide e vincristina), seguita da 2 cicli di induzione COPADM (basati su ciclofosfamide e MTX a 3 g/m<sup>2</sup>), da 2 cicli di consolidamento CYM (basati su MTX a 3 g/m<sup>2</sup> e citarabina a basse dosi) e da un mantenimento (M1) sempre basato su MTX a 3 g/m<sup>2</sup>.

La somministrazione del MTX avveniva in 3 ore. Nel caso in cui la prima rivalutazione di malattia (dopo la prefase di 7 giorni) classificasse il paziente come *slow responder* il paziente veniva passato al gruppo ad alto rischio C. Il gruppo C prevedeva quindi un trattamento più intenso con 8 cicli di terapia: prefase, 2 cicli COPADM potenziato con MTX a 8 g/m<sup>2</sup> in 4 ore, 2 cicli CYVE (basato su citarabina ad alte dosi ed etoposide), e 4 cicli di mantenimento rotazionale (M1-4, che includeva MTX a 8 g/m<sup>2</sup> in 4 ore nel primo

ciclo M1). Inoltre, nel caso di pazienti con coinvolgimento del SNC veniva eseguita anche la RT craniale con 24 Gy. Una valutazione dello stato di malattia dopo 4 cicli di terapia sia per il rischio intermedio B che per il gruppo ad alto rischio C indirizzava ad una potenziale intensificazione con alte dosi di terapia con *rescue* di cellule staminali autologhe<sup>(7)</sup>. La EFS a 5 anni per i pazienti del gruppo B era 92%, e 84% per i pazienti del gruppo C (n=123). Sebbene questo studio non stratificasse la terapia in base al valore di LDH, i risultati mostravano una EFS a 5 anni più bassa per i pazienti con LDH elevato, cioè >2 volte il limite maggiore del valore normale (87% vs 95%, p<0,001). In analisi multivariata, l'alto valore di LDH, l'età ≥15 anni, e la scarsa risposta alla prefase citoriduttiva COP, risultarono fattori prognostici indipendenti per un *outcome* peggiore nel protocollo LMB89. L'interessamento del SNC alla diagnosi, invece, risultò essere l'unico fattore prognostico negativo nel gruppo C. Sul totale dei pazienti in studio a rischio intermedio e ad alto rischio, 126 avevano una massa residua, o una "immagine sospetta", alle rivalutazioni radiologiche eseguite dopo 4 cicli di terapia. Di questi pazienti, 113 furono sottoposti a *second look* chirurgico ma solo 12 pazienti avevano un residuo tumorale con cellule vitali. Anche in questa casistica la maggior parte dei pazienti aveva un BL/BL-like (420 pazienti) e solo 63 pazienti avevano un DLBCL. Non c'erano differenze significative in termini di sopravvivenza tra questi 2 sottogruppi istologici: EFS a 5 anni pari a 92% e 89% per BL e DLBCL, rispettivamente<sup>(7)</sup>.

Lo studio FAB/LMB96, derivato dal protocollo LMB89, fu uno sforzo collaborativo che arruolò pazienti a rischio intermedio e ad alto rischio dal COG, SFOP, e UKCCSG,<sup>(26)</sup> oltre ai pazienti a basso rischio descritti in precedenza. Tra gli obiettivi dello studio c'erano la riduzione del dosaggio dei farmaci, soprattutto della ciclofosfamide per evitare la sterilità nei maschi e la minor durata dei trattamenti e l'abolizione della RT craniale<sup>(26, 27, 44)</sup>. I pazienti nel gruppo di rischio intermedio B, che mostravano una risposta >20% della massa tumorale al giorno +7, venivano randomizzati a ricevere una riduzione della dose di ciclofosfamide nel secondo ciclo COPADM (prima randomizzazione) e l'omissione del mantenimento M1 (seconda randomizzazione). Furono randomizzati e valutati 637 pazienti a rischio intermedio, inclusi 145 (23%) con DLBCL.

Complessivamente, la terapia fu ridotta con successo nei pazienti con rapida risposta alle terapie senza impatto sulla sopravvivenza (EFS a 4 anni pari al 92,2%).<sup>(26)</sup> La EFS a 4 anni per tutti i DLBCL (non mediastinici) randomizzati fu 92,7%, sovrapponibile alla EFS dei BL risultata pari a 93,3%.

Per i pazienti ad alto rischio con leucemia B (LLA-B)/LNH B con infiltrazione BM e/o SNC, il trial FAB/LMB96 propose uno studio randomizzato nel tentativo di ridurre l'intensità e la durata delle terapie (riduzione di citarabina più etoposide e omissione di 3 mantenimenti M1, M2 e M3) rispetto alla terapia standard. Lo studio

fu condotto su 190 pazienti, tutti in RC dopo 3 cicli di terapia, e concluse che la terapia standard FAB/LMB 96 è raccomandata per tutti i pazienti ad alto rischio con interessamento MO e/o SNC (EFS a 4 anni 90% terapia standard vs 80% terapia ridotta)<sup>(27)</sup>.

#### **Protocolli POG**

Il POG trattò i pazienti con DLBCL con gli stessi schemi terapeutici utilizzati per altri linfomi a grandi cellule, inclusi gli ALCL. Pazienti in stadio avanzato di malattia, stadio III e IV, ricevettero una terapia per la durata di 1 anno ed erano randomizzati a ricevere, dopo la fase di induzione secondo protocollo APO (doxorubicina, vincristina, prednisone, 6-mercaptopurina, e MTX) un mantenimento basato o su schema APO o su schema APO alternato a dosi intermedie di MTX e citarabina (IDM/HiDAC). Furono arruolati 180 pazienti, di cui 73 con DLBCL. La EFS a 4 anni per tutti i pazienti randomizzati fu pari a 67,4%, e la OS 80,1%. In particolare, la EFS a 4 anni per i pazienti con DLBCL risultò 63,8% nel braccio APO vs 70,3% nel secondo IDM/HiDAC. Non si osservarono differenze nella sopravvivenza neppure tra i LNH-B e gli ALCL.

In questa casistica mista di LNH non è stato possibile evidenziare fattori prognostici significativi. Sei pazienti eseguirono RT per incompleta risposta alle terapie<sup>(43)</sup>.

#### **Protocollo collaborativo internazionale: Inter B-NHL Ritux 2010**

Nel 2011 è stato avviato un nuovo progetto collaborativo tra il gruppo europeo EICNHL (*European Intergroup for Children Non Hodgkin's Lymphoma*) e il COG. Il progetto ha dato vita ad un trial clinico, denominato *Inter B-NHL Ritux 2010* (NCT01595048), diviso in due fasi di studio (fase III randomizzata e fase II non randomizzata) riservato ai LNH-B ad alto rischio (PMLBCL inclusi) con l'obiettivo di valutare l'efficacia e la sicurezza del rituximab nei pazienti di età <18 anni. Lo studio randomizzato di fase III prevedeva l'aggiunta di sei somministrazioni di rituximab allo schema francese FAB/LMB96 per i pazienti affetti da LNH-B e LLA-B; lo studio di fase II prevedeva l'aggiunta di 6 somministrazioni di rituximab allo schema DA-EPOCH per tutti i pazienti affetti da PMLBCL<sup>(2)</sup>.

Lo studio si è basato sui dati preliminari del COG che aveva condotto uno studio pilota, il COG ANHL01P1, per valutare l'efficacia e la tossicità dell'aggiunta di rituximab allo schema terapeutico del gruppo B e C del regime terapeutico FAB/LMB96. I pazienti eleggibili avevano < 30 anni, nuova diagnosi di LNH-B, gruppo di rischio B o C, e positività per CD20<sup>(59)</sup>. Lo studio COG ANHL01P1 era costituito da due parti: 1) uno studio subpilota in cui erano stati arruolati 7 pazienti trattati con 4 dosi aggiuntive di rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>), somministrate ciascuna al giorno -2 e al giorno 0 dei due cicli COPADM; 2) uno studio pilota in cui erano stati arruolati 38 pazienti trattati con 6 dosi aggiuntive di rituximab (375 mg/m<sup>2</sup>), somministrate ciascuna al giorno -2 e al giorno 0 dei 2 cicli COPADM e al giorno 0 dei 2 cicli CYM (gruppo B) o dei 2 cicli CYVE (gruppo C). Lo studio ha mostrato una EFS a 3 anni,

per i 45 pazienti arruolati, del 95% e una sovrapponibile OS (*Overall survival*), pari al 95%. Inoltre questo schema immuno-terapeutico ha dimostrato ottimi risultati in termini di sicurezza e in linea con gli altri studi di tossicità condotti sugli schemi basati sulla sola chemioterapia.<sup>(59)</sup> Questi risultati hanno giustificato l'inizio dell'ampio studio randomizzato *Inter B-NHL Ritux 2010*. La prima analisi *ad interim* ha confrontato i risultati di 310 pazienti arruolati nella fase III dello studio (155 pazienti in ogni braccio terapeutico). Globalmente i pazienti con BL erano l'85% dell'intera coorte di pazienti. I risultati in termini di EFS hanno rispecchiato i dati pubblicati dal COG. Con una mediana di *follow up* di circa un anno, la EFS dei pazienti randomizzati a ricevere il rituximab in aggiunta alla chemioterapia è stata del 94,2% mentre la EFS dei pazienti che hanno ricevuto la sola chemioterapia è stata del 81,5%. Sulla base di questi risultati e sulle raccomandazioni del IDSMC, il comitato direttivo e lo sponsor dello studio *Inter B-NHL Ritux 2010*, hanno sospeso la randomizzazione e concluso che, per i bambini e adolescenti affetti da LNH-B ad alto rischio, incluse le LLA-B, il trattamento consigliato è il regime chemioterapico LMB associato a 6 iniezioni di Rituximab.

Gli studi di sicurezza del farmaco sono ancora in corso<sup>(60)</sup>.

#### **Confronto tra chemioterapie utilizzate per DLBCL**

È difficile confrontare direttamente i regimi terapeutici descritti per gli stadi avanzati di DLBCL, a causa soprattutto della diversa stratificazione dei gruppi di rischio utilizzata per i pazienti. Complessivamente le sopravvivenze, in tutti i trials, sono migliorate. Soltanto i risultati del POG, che ha trattato i DLBCL con altri linfomi a grandi cellule, inclusi gli ALCL, ha ottenuto EFS più basse rispetto a quelle ottenute dai gruppi BFM e SFOP, che hanno avuto un approccio mirato solo ai LNH a cellule B. In conseguenza a ciò, tutti i trials più recenti hanno preferito trattare i DLBCL con le terapie disegnate per i LNH a immunofenotipo B. Interessante notare che sia BFM che SFOP hanno usato approcci simili per intensificare la terapia per il gruppo di pazienti in stadio avanzato aumentando la durata delle terapie, incrementando l'uso della terapia intratecale, ed intensificando la dose del MTX e della citarabina. In ogni caso, la durata totale delle terapie è relativamente breve, tipicamente meno di 6 mesi, o meno per i pazienti a rischio intermedio. Sottili differenze nei regimi terapeutici, comunque, possono essere importanti per cercare di ridurre la tossicità, come il tentativo di ridurre il tempo di infusione del MTX da 24 ore a 4 ore, simile a quello usato nello studio SFOP, che però risultò in una sopravvivenza minore nello studio NHL-BFM95<sup>(9)</sup>. Come notato per i pazienti a basso rischio, la tossicità, sia acuta che a lungo termine, è stata presa molto in considerazione nella scelta del trattamento soprattutto per gli alti rischi dove la dose terapeutica totale è sicuramente maggiore. Dati pubblicati dallo studio FAB/LMB96 suggeriscono che la terapia può essere ridotta senza compromettere la sopravvivenza per alcuni pazienti

a rischio intermedio<sup>(27)</sup>. Al contrario, per i pazienti ad alto rischio, la riduzione dell'intensità della terapia risultò in sopravvivenze complessive inferiori<sup>(27)</sup>.

Lo studio NHL-BFM90 valutò 413 pazienti. Essi riportarono tre morti precoci durante il trattamento dovute a sindrome da lisi tumorale acuta, e ulteriori 11 morti dovute a tossicità in corso di terapia. Due pazienti svilupparono secondo tumore, entrambi un LNH secondario.<sup>(8)</sup>

Lo studio NHL-BFM95 arruolò 457 pazienti nei gruppi di rischio R2, R3, e R4. Ci fu una morte per sindrome da lisi tumorale acuta in un paziente con LLA-B, e 10 morti dovute a sepsi in terapia, due pazienti svilupparono secondo tumore.<sup>(9)</sup> Mentre la sindrome da lisi tumorale acuta è attesa e rappresenta una vera urgenza clinica nei BL/BL-like, come pure nella LLA-B, essa è molto rara nei DLBCL. Lo studio LMB89 arruolò un totale di 509 pazienti nei gruppi di rischio B e C. Essi riportarono 8 morti dovute a tossicità da terapia. Ci furono 6 eventi dopo 3 anni: un disordine mieloproliferativo e cinque secondi tumori, tra cui un sarcoma di Ewing, due LNH, un astrocitoma anaplastico, e un tumore neuroectodermico primitivo del SNC<sup>(7)</sup>.

Nello studio FAB/LMB96 tra i 637 pazienti a rischio intermedio randomizzati, non ci furono morti dovute a tossicità alle terapie, ma una morte tardiva non correlata al linfoma e un secondo tumore (BL)<sup>(27)</sup>. Nello studio FAB/LMB96 per gli alti rischi, invece, su 190 pazienti randomizzati furono registrate 3 morti precoci, 8 decessi dovuti a tossicità in corso di terapia, e 2 secondi tumori (una leucemia mieloide acuta e una leucemia linfoblastica acuta)<sup>(27)</sup>. Non sono ancora disponibili dati sulla tossicità precoce e tardiva relativa ai pazienti registrati nel trial internazionale di fase III, *Inter B-NHL Ritux 2010*.

## DLBCL primitivo del mediastino

Il PMLBCL, derivante da cellule B mature del timo, rappresenta un raro sottogruppo di LNH a cellule B. Il PMLBCL è stato descritto per la prima volta, come sottogruppo, nella popolazione adulta all'inizio del 1980<sup>(61,62)</sup>. Esso è principalmente diagnosticato nei giovani adulti di sesso femminile con età mediana di 28-35 anni. Il PMBCL, che era considerato un sottotipo di DLBCL, attualmente è considerato un'entità separata dalla classificazione più recente del WHO<sup>(15)</sup>. Nella popolazione pediatrica il PMBCL si manifesta prevalentemente negli adolescenti, e rappresenta circa 1-2% di tutti i casi di LNH pediatrico e il 2-7% di tutti i LNH a grandi cellule B<sup>(48,63-65)</sup>.

Gli studi di immunoistochimica e di *microarray* nei tumori degli adulti suggeriscono delle caratteristiche biologiche peculiari dei PMLBCL rispetto agli altri sottotipi di LNH<sup>(65,66)</sup>. Il PMLBCL può essere morfologicamente difficile da distinguere dai seguenti tipi di linfoma<sup>(20,65,67)</sup>:

- DLBCL: i marker di superficie cellulare sono simili a quelli del DLBCL, come CD19, CD20, CD22, CD79a e PAX-5. Il PMBCL

spesso non ha sulla superficie cellulare l'espressione di immunoglobuline, che possono essere intracitoplasmatiche. L'espressione del CD30 è spesso presente;

- linfoma di Hodgkin (LH): il PMLBCL può essere difficile da distinguere dal LH clinicamente e morfologicamente, soprattutto se la biopsia mediastinica è piccola a causa dell'estesa sclerosi e per la presenza di necrosi.

Il PMLBCL presenta delle caratteristiche alterazioni cromosomiche (*gain* del cromosoma 9p e 2p nella regione che codifica per *JAK2* e *c-Rel* rispettivamente) e spesso mostra l'inattivazione di *SOCS-1* a causa di mutazioni del gene o della sua delezione. Il PMBCL ha un profilo genetico diverso da quello del DLBCL, ma con caratteristiche simile a quelle del LH. Si manifesta alla diagnosi nel 97% dei casi in stadio III, con una grande massa mediastinica caratterizzata da una proliferazione cellulare con sclerosi che compartimentalizza le cellule neoplastiche (Figura 2). È frequente il coinvolgimento delle strutture adiacenti e dei polmoni, e spesso si associa alla sindrome della vena cava superiore (da compressione o trombosi vascolare) e/o a difficoltà respiratoria dovuta a ostruzione dei bronchi e/o della trachea. Circa il 40% dei bambini si presenta con versamenti pleurici e/o pericardici. L'interessamento extratoracico viene descritto raramente, tra le sedi più frequentemente riportate vengono segnalate quella renale (24%), e l'infiltrazione focale della milza (9%) o del fegato (9%), mentre è rarissima la diffusione al MO (3%) o al SNC, anche se in alcune casistiche non è nulla. Sebbene l'interessamento renale sia relativamente frequente, l'insufficienza renale alla diagnosi è un evento rarissimo<sup>(48,63)</sup>. Poiché i PMLBCL rappresentano una piccola percentuale dei LNH-B, poche sono le casistiche di bambini e adolescenti riportate in letteratura. Storicamente questi pazienti sono stati trattati con protocolli per i pazienti affetti da DLBCL. Focalizzando l'attenzione sui sottogruppi in serie pediatriche (<18 anni), sono stati riportati vari risultati.

Il COG riportò 20 pazienti con linfoma mediastinico trattato dal 1977 al 1993. Età variabile dai 4 ai 19 anni, nella maggior parte dei casi i pazienti erano di sesso maschile (55%). Questi casi comprendevano tumori a cellule B e a cellule T. Tutti i pazienti ottennero la RC da malattia, ricevendo vari regimi chemioterapici con o senza RT. La EFS a 5 anni era del 75% e la OS era del 85%. Questi risultati riguardavano sia pazienti con malattia localizzata (EFS e OS 92% e 97%, rispettivamente) che pazienti con malattia disseminata (EFS e OS 50% e 63%, rispettivamente). La RT non sembrava dare un significativo vantaggio<sup>(63)</sup>. Altre serie riportano risultati simili con combinazioni di farmaci senza RT.

Uno studio retrospettivo del BFM ha riportato i risultati di una serie di 30 pazienti con PMLBCL trattati in 3 protocolli consecutivi dal 1986 al 1999. Questi pazienti rappresentavano meno del 2% dei pazienti trattati nei protocolli. I pazienti trattati, 50% dei quali di sesso maschile, avevano un'età mediana di 14,3 anni. Tutti i casi



Figura 2 - Immagine TAC di localizzazione mediastinica di PMLBCL.

erano in stadio III (tumore mediastinico senza interessamento del midollo o del SNC). Il confronto tra i pazienti con PMLBCL e gli altri pazienti affetti da LNH-B in stadio III arruolati nei 3 protocolli consecutivi ha evidenziato un *outcome* inferiore, anche se non statisticamente significativo, nei pazienti affetti da PMLBCL (EFS a 5 anni, 75% vs 85%)<sup>(48)</sup>.

Nel più recente studio NHL-BFM95 sono stati registrati 15 casi con PMLBCL, cioè il 3% dei pazienti studiati. La EFS a 3 anni ha mostrato ancora una volta l'inferiorità dell'*outcome* per questo sottogruppo di pazienti (53%). Tutte le ricadute sono state a livello locale.<sup>(9)</sup> Anche nel protocollo internazionale FAB/LMB96 i pazienti con PMLBCL hanno mostrato una sopravvivenza inferiore rispetto ai pazienti con un DLBCL non mediastinico (EFS a 4 anni: 71,5% vs 92,7%)<sup>(26)</sup>. Uno studio americano del 2013 condotto su giovani adulti affetti da PMLBCL, trattati secondo lo schema DA-EPOCH-R ha mostrato una EFS a 5 anni del 93% con OS del 97%<sup>(68)</sup>. La chemioterapia somministrata secondo questo schema prevedeva la modulazione dei farmaci (DA=*dose adjusted*) in base alla tossicità che il paziente presentava durante e dopo i cicli e l'aggiunta del rituximab. I cicli somministrati erano 6 e non era previsto l'utilizzo di RT. Il breve *follow up* riportato non evidenziava un aumento di tossicità cardiaca, nonostante l'elevata quantità di antracicline.

Gli eccellenti risultati ottenuti con il protocollo DA-EPOCH-R nella popolazione dei giovani adulti, hanno spinto il gruppo BFM ad applicare questo schema terapeutico ai pazienti pediatrici ma modificando la dose totale di antracicline (360 mg/m<sup>2</sup>) e inserendo la terapia intratecale per prevenire le ricadute SNC. Lo studio del BFM

condotto su 15 pazienti ha mostrato una OS a 2 anni del 92%<sup>(69)</sup>. Entrambi i risultati hanno permesso di porre le basi per strutturare uno studio clinico internazionale pediatrico di fase II per i PMLBCL pediatrici, studio *Inter B-NHL Ritux 2010* (NCT01595048), basato sul DA-EPOCH-R modificato<sup>(2)</sup>. Lo studio purtroppo non ha mostrato un miglioramento della EFS, a 2 anni risultata del 69%<sup>(70)</sup>, rispetto al controllo storico, in contrasto anche con i risultati pubblicati negli adulti. Inoltre, a differenza degli adulti, nel trattamento con DA-EPOCH-R l'effetto avverso più rilevante in età pediatrica è risultata la trombosi (45,9% dei pazienti pediatrici trattati, vs 22,9% degli adulti)<sup>(71)</sup>.

Nel 2018 l'AIEOP ha pubblicato i dati relativi a 13 pazienti trattati secondo le linee guida nazionali interinali per PMLBCL mostrando a 5 anni una OS del 91,7% e una EFS del 83,9%<sup>(51)</sup>. Queste linee guida erano state adattate dal protocollo AIEOP LNH-97<sup>(37)</sup>, utilizzato dai centri AIEOP per il trattamento dei LNH-B, notando una sopravvivenza inferiore per i pazienti con PMLBCL rispetto ai pazienti con BL o con DLBCL. Le linee guida prevedevano, rispetto al protocollo di base, un aumento del dosaggio di doxorubicina e l'aggiunta di 6 dosi di rituximab. Dopo una prefase di 5 giorni, i pazienti nel gruppo di rischio standard ricevevano 6 cicli di MTX a 1 g/m<sup>2</sup> mentre i pazienti ad alto rischio (diametro massa mediastinica ≥10 cm e LDH ≥500 UI/L) ricevevano 7 cicli di MTX (3 g/m<sup>2</sup>). Era prevista la profilassi intratecale durante ciascun ciclo chemioterapico. Gli ottimi risultati di questa piccola casistica hanno confermato il potenziale ruolo del rituximab nel trattamento del PMLBCL pediatrico. La rarità di incidenza del PMLBCL non ha permesso di

identificare dei definitivi fattori prognostici in età pediatrica. Ciò che si è potuto osservare, sia nella popolazione adulta che pediatrica, è una lenta riduzione nelle misure della massa mediastinica<sup>(48)</sup>. Si è ipotizzato che la lenta risposta del tumore, valutata radiologicamente, possa essere dovuto sia alla cospicua presenza di fibrosi o tessuto necrotico che al tumore. Diventa quindi difficile stabilire se la presenza di un residuo possa essere imputabile solo a una cattiva risposta terapeutica. Nè il *second look* chirurgico, nè la remissione radiologica possono predire il rischio di ricaduta in modo affidabile<sup>(63)</sup>. Sembra invece possibile che nuove tecniche diagnostiche, come la PET, possano avere un maggior ruolo predittivo, come è stato dimostrato negli adulti<sup>(41, 42)</sup>.

In conclusione, risulta difficile sapere se l'esperienza clinica negli adulti può essere veramente applicata ai linfomi pediatrici poiché non è ancora del tutto chiaro se il PMLBCL che si osserva negli adulti sia la stessa entità che si osserva in pediatria. Soltanto studi collaborativi internazionali permetteranno di definire la terapia ottimale per i bambini e gli adolescenti con questo raro sottotipo di LNH.

## Chirurgia

Come detto in precedenza, la stratificazione in gruppi di rischio si basa sull'estensione della resezione, specialmente per i tumori a sede addominale. Quanto questo sia importante per il DLBCL non è mai stato analizzato in modo specifico ma, visti gli ottimi risultati terapeutici ottenuti, sembra appropriato eseguire una resezione completa quando possibile.

Gli studi NHL-BFM90 e SFOP89 usavano la procedura di *second look* chirurgico per stabilire la natura del residuo tumorale in corso di terapia, o al termine delle terapie<sup>(7, 8)</sup>. Il rischio di una procedura invasiva superava di gran lunga il beneficio soprattutto per i pazienti a basso rischio. Il *second look* viene ancora consigliato nei pazienti ad alto rischio prima di una eventuale intensificazione terapeutica. Nuove metodiche radiologiche, come la PET, meno invasive, potranno essere utili per valutare la natura di tali residui<sup>(41, 42)</sup>.

## Radioterapia

Nel LNH pediatrico, le terapie sono state disegnate per ridurre l'esposizione alla RT. Questo con l'intento di ridurre al minimo gli effetti a distanza delle terapie e soprattutto il rischio di secondo tumore nel campo di irradiazione. I risultati descritti in precedenza per la cura dei LNH pediatrici mostrano eccellenti risultati minimizzando l'uso della RT, il cui uso rimane limitato ai pazienti con malattia SNC e a quelli con inadeguata risposta alle terapie.

## Trattamento delle ricadute

Ad oggi, circa il 5% -10% dei pazienti pediatrici con DLBCL, così come pure i BL, sono refrattari al trattamento di prima linea o recidivano entro 12 mesi dalla fine della terapia<sup>(4, 64)</sup>. La prognosi per

questi pazienti è piuttosto severa, con una sopravvivenza globale inferiore al 20%<sup>(3, 72)</sup>. A causa del basso numero di pazienti con DLBCL o BL refrattario o recidivato, sono stati condotti solo piccoli studi di coorte in questa popolazione.

Il COG ha condotto uno studio sui pazienti resistenti/recidivati con LNH-B/LLA-B per valutare l'efficacia dello schema R-ICE<sup>(73)</sup>, combinando il rituximab allo schema ICE (ifosfamide-carboplatino-etoposide)<sup>(74, 75)</sup>, già utilizzato nel LNH pediatrico resistente/recidivato. Lo studio è stato chiuso prematuramente a causa di un insufficiente arruolamento di pazienti. Tre dei 6 DLBCL arruolati hanno ottenuto la RC e 4 dei 14 BL. Sei pazienti sono stati consolidati con TCSE. La conclusione dello studio è stata che R-ICE è associato a risposte incoraggianti e ad un profilo di tossicità accettabile<sup>(73)</sup>.

Se R-ICE è stato e continua ad essere il regime di trattamento di seconda linea più comunemente usato per i DLBCL e BL, lo schema terapeutico R-VICI (rituximab, vincristina, ifosfamide, carboplatino e idarubicina) proposto dal gruppo tedesco BFM sembra dare risultati migliori<sup>(76)</sup>.

Il TCSE autologo o allogenico è indicato nei pazienti con DLBCL resistente o ricaduto, una volta ottenuta la RC con la terapia di seconda linea, al fine di consolidare lo stato di remissione. Il COG ha pubblicato un'ampia casistica di 52 DLBCL trapiantati la cui EFS è stata 52% e 50%, rispettivamente per TCSE autologo (35 pazienti) e allogenico (17 pazienti). Risultati migliori sono stati ottenuti nel gruppo di pazienti trapiantati in RC<sup>(77)</sup>.

Le nuove terapie *target* (es. Ibrutinib, Idelalisib), usate con successo nei trials degli adulti, cominciano ad essere utilizzate in pediatria all'interno di studi clinici controllati, combinate con le terapie convenzionali, spesso come *bridge* al trapianto.

## Prospettive future

Le terapie attuali hanno permesso di ottenere un'eccellente sopravvivenza dei DLBCL. Poiché nel corso degli anni i DLBCL sono stati trattati con gli stessi schemi terapeutici di altri LNH-B, al fine di chiarire i fattori prognostici e finalizzare la terapia dovrebbero essere fatti ulteriori sforzi per trattare i DLBCL come un'entità separata e stratificare la terapia sulla base della biologia molecolare e della clinica. Sicuramente, infatti, ci sono differenze sia cliniche che istologiche tra i DLBCL e i BL/BL-like. Una differenza significativa è l'incidenza dell'interessamento del SNC, ad esempio, che può implicare una terapia disegnata per ottimizzare la sopravvivenza nei BL/BL-like ma che non è ideale per i DLBCL. Il tempo di ricaduta è pure diverso. A differenza dei BL/BL-like, in cui la maggior parte delle ricadute avviene entro un anno, gli studi LMB89/96 riportano ricadute di DLBCL fino a 54 mesi<sup>(26)</sup>. Anche lo studio POG aveva dimostrato che i DLBCL erano diversi da altri linfomi a grandi cellule, inclusi gli ALCL, e che dovevano essere trattati come una entità biologicamente distinta. Questo è molto rilevante soprattutto quando si considerano

terapie *target* come il rituximab nei LNH-B. Le terapie *target* sono state usate con successo nei trials degli adulti, combinate con le terapie convenzionali, migliorandone la sopravvivenza<sup>(28)</sup>.

È ancora in fase di analisi lo studio per valutare se l'aggiunta del rituximab agli schemi convenzionali può migliorare la sopravvivenza dei DLBCL pediatrici, come pure sono in fase di sperimentazione

altri agenti *target* per i LNH-B pediatrici, sempre mutuati dal mondo degli adulti<sup>(28)</sup>.

Una maggiore collaborazione a livello internazionale, anche con gli oncologi dell'adulto, e i futuri studi di biologia molecolare e di espressione genica permetteranno di migliorare le terapie dei pazienti adolescenti e giovani adulti con questa rara patologia.

## Bibliografia

1. Raetz E, Perkins S, Davenport V, Cairo MS. B large-cell lymphoma in children and adolescents. *Cancer Treat Rev*. 2003;29(2):91-8.
2. Minard-Colin V, Brugières L, Reiter A, Cairo MS, Gross TG, Woessmann W, et al. Non-Hodgkin Lymphoma in Children and Adolescents: Progress Through Effective Collaboration, Current Knowledge, and Challenges Ahead. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2963-74.
3. Reiter A, Klapper W. Recent advances in the understanding and management of diffuse large B-cell lymphoma in children. *Br J Haematol*. 2008;142(3):329-47.
4. Lange J, Burkhardt B. Treatment of adolescents with aggressive B-cell malignancies: the pediatric experience. *Curr Hematol Malig Rep*. 2013;8(3):226-35.
5. Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, Wu X, Jamison PM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer*. 2004;101(1):3-27.
6. Sandlund JT, Martin MG. Non-Hodgkin lymphoma across the pediatric and adolescent and young adult age spectrum. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016;2016(1):589-97.
7. Patte C, Auperin A, Michon J, Behrendt H, Leverger G, Frappaz D, et al. The Société Française d'Oncologie Pédiatrique LMB89 protocol: highly effective multi-agent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. *Blood*. 2001;97(11):3370-9.
8. Reiter A, Schrappe M, Tiemann M, Ludwig WD, Yakisan E, Zimmermann M, et al. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood*. 1999;94(10):3294-306.
9. Woessmann W, Seidemann K, Mann G, Zimmermann M, Burkhardt B, Oschlies I, et al. The impact of the methotrexate administration schedule and dose in the treatment of children and adolescents with B-cell neoplasms: a report of the BFM Group Study NHL-BFM95. *Blood*. 2005;105(3):948-58.
10. Link M, Devidas M, Murphy S, Behm F, Hutchison R. Favorable treatment outcome of children with early stage large B-cell and anaplastic large cell lymphomas. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol*. 2003;04-AB-779.
11. Levine AM. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. *Blood*. 1992;80(1):8-20.
12. Seidemann K, Tiemann M, Henze G, Sauerbrey A, Müller S, Reiter A. Therapy for non-Hodgkin lymphoma in children with primary immunodeficiency: analysis of 19 patients from the BFM trials. *Med Pediatr Oncol*. 1999;33(6):536-44.
13. Attarbaschi A, Carraro E, Abla O, Barzilai-Birenboim S, Bomken S, Brugieres L, et al. Non-Hodgkin lymphoma and pre-existing conditions: spectrum, clinical characteristics and outcome in 213 children and adolescents. *Haematologica*. 2016;101(12):1581-91.
14. Sandlund JT, Downing JR, Crist WM. Non-Hodgkin's lymphoma in childhood. *N Engl J Med*. 1996;334(19):1238-48.
15. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
16. Miles RR, Raphael M, McCarthy K, Wotherspoon A, Lones MA, Terrier-Lacombe MJ, et al. Pediatric diffuse large B-cell lymphoma demonstrates a high proliferation index, frequent c-Myc protein expression, and a high incidence of germinal center subtype: Report of the French-American-British (FAB) international study group. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;51(3):369-74.
17. Oschlies I, Klapper W, Zimmermann M, Krams M, Wacker HH, Burkhardt B, et al. Diffuse large B-cell lymphoma in pediatric patients belongs predominantly to the germinal-center type B-cell lymphomas: a clinicopathologic analysis of cases included in the German BFM (Berlin-Frankfurt-Munster) Multicenter Trial. *Blood*. 2006;107(10):4047-52.
18. Szczepanowski M, Lange J, Kohler CW, Masque-Soler N, Zimmermann M, Aukema SM, et al. Cell-of-origin classification by gene expression and MYC-rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma of children and adolescents. *Br J Haematol*. 2017;179(1):116-9.
19. Deffenbacher KE, Iqbal J, Sanger W, Shen Y, Lachel C, Liu Z, et al. Molecular distinctions between pediatric and adult mature B-cell non-Hodgkin lymphomas identified through genomic profiling. *Blood*. 2012;119(16):3757-66.
20. Dave BJ, Weisenburger DD, Higgins CM, Pickering DL, Hess MM, Chan WC, et al. Cytogenetics and fluorescence in situ hybridization studies of diffuse large B-cell lymphoma in children and young adults. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;153(2):115-21.
21. Baron BW, Anastasi J, Montag A, Huo D, Baron RM, Karrison T, et al. The human BCL6 transgene promotes the development of lymphomas in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(39):14198-203.
22. Kusam S, Vasanwala FH, Dent AL. Transcriptional repressor BCL-6 immortalizes germinal center-like B cells in the absence of p53 function. *Oncogene*. 2004;23(3):839-44.
23. Cattoretti G, Pasqualucci L, Ballon G, Tam W, Nandula SV, Shen Q, et al. Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell*. 2005;7(5):445-55.
24. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
25. Murphy SB. Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults. *Semin Oncol*. 1980;7(3):332-9.
26. Patte C, Auperin A, Gerrard M, Michon J, Pinkerton R, Sposto R, et al. Results of the randomized international FAB/LMB96 trial for intermediate risk B-cell non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents: it is possible to reduce treatment for the early responding patients. *Blood*. 2007;109(7):2773-80.
27. Cairo MS, Gerrard M, Sposto R, Auperin A, Pinkerton CR, Michon J, et al. Results of a randomized international study of high-risk central nervous system B non-Hodgkin lymphoma and B acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents. *Blood*. 2007;109(7):2736-43.
28. Miles RR, Cairo MS, Satwani P, Zwick DL, Lones MA, Sposto R, et al. Immunophenotypic identification of possible therapeutic targets in paediatric non-Hodgkin lymphomas: a children's oncology group report. *Br J Haematol*. 2007;138(4):506-12.
29. Mussolin L, Basso K, Pillon M, D'Amore ES, Lombardi A, Luzzatto L, et al. Prospective analysis of minimal bone marrow infiltration in pediatric Burkitt's lymphomas by long-distance polymerase chain reaction for t(8;14)(q24;q32). *Leukemia*. 2003;17(3):585-9.

30. Mussolin L, Pillon M, d'Amore ES, Santoro N, Lombardi A, Fagioli F, et al. Prevalence and clinical implications of bone marrow involvement in pediatric anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*. 2005;19(9):1643-7.
31. Lovisa F, Mussolin L, Corral L, Pillon M, Cazzaniga G, Biondi A, et al. IGH and IGK gene rearrangements as PCR targets for pediatric Burkitt's lymphoma and mature B-ALL MRD analysis. *Lab Invest*. 2009;89(10):1182-6.
32. Mussolin L, Pillon M, d'Amore ES, Conter V, Piglione M, Lo Nigro L, et al. Minimal disseminated disease in high-risk Burkitt's lymphoma identifies patients with different prognosis. *J Clin Oncol*. 2011;29(13):1779-84.
33. Schneider C, Setty M, Holmes AB, Maute RL, Leslie CS, Mussolin L, et al. MicroRNA 28 controls cell proliferation and is down-regulated in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(22):8185-90.
34. Mussolin L, Pillon M, Conter V, Piglione M, Lo Nigro L, Pierani P, et al. Prognostic role of minimal residual disease in mature B-cell acute lymphoblastic leukemia of childhood. *J Clin Oncol*. 2007;25(33):5254-61.
35. Shiramizu B, Goldman S, Smith L, Agsalda-Garcia M, Galardy P, Perkins SL, et al. Impact of persistent minimal residual disease post-consolidation therapy in children and adolescents with advanced Burkitt leukaemia: a Children's Oncology Group Pilot Study Report. *Br J Haematol*. 2015;170(3):367-71.
36. Rosolen A, Perkins SL, Pinkerton CR, Guilleman RP, Sandlund JT, Patte C, et al. Revised International Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma Staging System. *J Clin Oncol*. 2015;33(18):2112-8.
37. Pillon M, Mussolin L, Carraro E, Conter V, Aricò M, Vinti L, et al. Detection of prognostic factors in children and adolescents with Burkitt and Diffuse Large B-Cell Lymphoma treated with the AIEOP LNH-97 protocol. *Br J Haematol*. 2016;175(3):467-75.
38. El-Mallawany NK, Cairo MS. Advances in the diagnosis and treatment of childhood and adolescent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2015;13(2):113-23.
39. Hermann S, Wormanns D, Pixberg M, Hunold A, Heindel W, Jürgens H, et al. Staging in childhood lymphoma: differences between FDG-PET and CT. *Nuklearmedizin*. 2005;44(1):1-7.
40. Reske SN, Kotzerke J. FDG-PET for clinical use. Results of the 3rd German Interdisciplinary Consensus Conference, "Onko-PET III", 21 July and 19 September 2000. *Eur J Nucl Med*. 2001;28(11):1707-23.
41. Mikhael NG, Hutchings M, Fields PA, O'Doherty MJ, Timothy AR. FDG-PET after two to three cycles of chemotherapy predicts progression-free and overall survival in high-grade non-Hodgkin lymphoma. *Ann Oncol*. 2005;16(9):1514-23.
42. Kostakoglu L, Goldsmith SJ, Leonard JP, Christos P, Furman RR, Atasever T, et al. FDG-PET after 1 cycle of therapy predicts outcome in diffuse large cell lymphoma and classic Hodgkin disease. *Cancer*. 2006;107(11):2678-87.
43. Laver JH, Kravka JM, Hutchison RE, Chang M, Kepner J, Schwenn M, et al. Advanced-stage large-cell lymphoma in children and adolescents: results of a randomized trial incorporating intermediate-dose methotrexate and high-dose cytarabine in the maintenance phase of the APO regimen: a Pediatric Oncology Group phase III trial. *J Clin Oncol*. 2005;23(3):541-7.
44. Hang MS, Weinstein HJ. Diffuse large B cell lymphoma in children. In: Magrath IT ed. *The lymphoid neoplasms*, 3rd Ed. London: Arnold E. 2010:1232-43.
45. Salzberg J, Burkhardt B, Zimmermann M, Wachowski O, Woessmann W, Oschlies I, et al. Prevalence, clinical pattern, and outcome of CNS involvement in childhood and adolescent non-Hodgkin's lymphoma differ by non-Hodgkin's lymphoma subtype: a Berlin-Frankfurt-Munster Group Report. *J Clin Oncol*. 2007;25(25):3915-22.
46. Suryanarayan K, Shuster JJ, Donaldson SS, Hutchison RE, Murphy SB, Link MP. Treatment of localized primary non-Hodgkin's lymphoma of bone in children: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol*. 1999;17(2):456-9.
47. Lones MA, Perkins SL, Sposto R, Tedeschi N, Kadin ME, Kjeldsberg CR, et al. Non-Hodgkin's lymphoma arising in bone in children and adolescents is associated with an excellent outcome: a Children's Cancer Group report. *J Clin Oncol*. 2002;20(9):2293-301.
48. Seidemann K, Tiemann M, Lauterbach I, Mann G, Simonitsch I, Stankewitz K, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma with sclerosis in pediatric and adolescent patients: treatment and results from three therapeutic studies of the Berlin-Frankfurt-Münster Group. *J Clin Oncol*. 2003;21(9):1782-9.
49. Poiré HA, Cairo MS, Heerema NA, Swansbury J, Aupérin A, Launay E, et al. Specific cytogenetic abnormalities are associated with a significantly inferior outcome in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Leukemia*. 2009;23(2):323-31.
50. Gerrard M, Waxman IM, Sposto R, Auperin A, Perkins SL, Goldman S, et al. Outcome and pathologic classification of children and adolescents with mediastinal large B-cell lymphoma treated with FAB/LMB96 mature B-NHL therapy. *Blood*. 2013;121(2):278-85.
51. Pillon M, Carraro E, Mussolin L, Conter V, Tondo A, Aricò M, et al. Primary mediastinal large B-cell lymphoma: Outcome of a series of pediatric patients treated with high-dose methotrexate and cytarabine plus anti-CD20. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(2) doi: 10.1002/pbc.26855. Epub 2017 Oct 19.
52. Cairo MS, Sposto R, Gerrard M, Auperin A, Goldman SC, Harrison L, et al. Advanced stage, increased lactate dehydrogenase, and primary site, but not adolescent age ( $\geq 15$  years), are associated with an increased risk of treatment failure in children and adolescents with mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB LMB 96 study. *J Clin Oncol*. 2012;30(4):387-93.
53. Pillon M, Aricò M, Mussolin L, Mainardi C, Giraldi E, Garaventa A, et al. Mediastinal Burkitt lymphoma in childhood. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(11):2127-8.
54. Gerrard M, Cairo MS, Weston C, Auperin A, Pinkerton R, Lambilliotte A, et al. Excellent survival following two courses of COPAD chemotherapy in children and adolescents with resected localized B-cell non-Hodgkin's lymphoma: results of the FAB/LMB 96 international study. *Br J Haematol*. 2008;141(6):840-7.
55. Pillon M, Di Tullio MT, Garaventa A, Cesaro S, Putti MC, Favre C, et al. Long-term results of the first Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology protocol for the treatment of pediatric B-cell non-Hodgkin lymphoma (AIEOP LNH92). *Cancer*. 2004;101(2):385-94.
56. Link MP, Shuster JJ, Donaldson SS, Berard CW, Murphy SB. Treatment of children and young adults with early-stage non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1997;337(18):1259-66.
57. Reiter A, Schrappe M, Parwaresch R, Henze G, Müller-Weihrich S, Sauter S, et al. Non-Hodgkin's lymphomas of childhood and adolescence: results of a treatment stratified for biologic subtypes and stage—a report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group. *J Clin Oncol*. 1995;13(2):359-72.
58. Meinhardt A, Burkhardt B, Zimmermann M, Borkhardt A, Kontny U, Klingebiel T, et al. Phase II window study on rituximab in newly diagnosed pediatric mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma and Burkitt leukemia. *J Clin Oncol*. 2010;28(19):3115-21.
59. Goldman S, Smith L, Anderson JR, Perkins S, Harrison L, Geyer MB, et al. Rituximab and FAB/LMB 96 chemotherapy in children with Stage III/IV B-cell non-Hodgkin lymphoma: a Children's Oncology Group report. *Leukemia*. 2013;27(5):1174-7.
60. Minar-Colin V, Auperin A, Pillon M, Burke A, Anderson JR, Barkauskas DA. Results of the randomized Intergroup trial Inter-B-NHL Ritux 2010 for children and adolescents with high-risk B-cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL) and mature acute leukemia (B-AL): Evaluation of rituximab (R) efficacy in addition to standard LMB chemotherapy (CT) regimen. *J Clin Oncol*. 2016;34(suppl). Abstract 10507.
61. Miller JB, Variakojis D, Bitran JD, Sweet DL, Kinzie JJ, Golomb HM, et al. Diffuse histiocytic lymphoma with sclerosis: a clinicopathologic entity frequently causing superior vena caval obstruction. *Cancer*. 1981;47(4):748-56.
62. Addis BJ, Isaacson PG. Large cell lymphoma of the mediastinum: a B-cell tumour of probable thymic origin. *Histopathology*. 1986;10(4):379-90.
63. Lones MA, Perkins SL, Sposto R, Kadin ME, Kjeldsberg CR, Wilson JF, et al. Large-cell lymphoma arising in the mediastinum in children and adolescents is associated with an excellent outcome: a Children's Cancer Group report. *J Clin Oncol*. 2000;18(22):3845-53.
64. Burkhardt B, Zimmermann M, Oschlies I, Niggli F, Mann G, Parwaresch R, et al. The impact of age and gender on biology, clinical features and treatment outcome of non-Hodgkin lymphoma in childhood and adolescence. *Br J Haematol*. 2005;131(1):39-49.
65. Oschlies I, Burkhardt B, Salaverria I, Rosenwald A, d'Amore ES, Szczepanowski M, et al. Clinical, pathological and genetic features of primary mediastinal large

- B-cell lymphomas and mediastinal gray zone lymphomas in children. *Haematologica*. 2011;96(2):262-8.
66. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberger D, De Leval L, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;102(12):3871-9.
  67. Bea S, Zetl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005;106(9):3183-90.
  68. Dunleavy K, Pittaluga S, Maeda LS, Advani R, Chen CC, Hessler J, et al. Dose-adjusted EPOCH-rituximab therapy in primary mediastinal B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;368(15):1408-16.
  69. Woessmann W, Lisfeld J, Burkhardt B, Group N-BS. Therapy in primary mediastinal B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2013;369(3):282.
  70. Burke A, Gross T, Pillon M, Minard-Colin V, Delgado R, Zsíros J, et al. Results of Inter-B-NHL Ritux 2010 - Phase II Study of DA-EPOCH-R for Children and Adolescents with Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma (PMLBL) on Behalf of European Intergroup for Childhood Non Hodgkin's Lymphoma (EICNHL) and Children's Oncology Group (COG). *Blood*. 2017;130:4124;
  71. Giulino-Roth L, O'Donohue T, Chen Z, Bartlett NL, LaCasce A, Martin-Doyle W, et al. Outcomes of adults and children with primary mediastinal B-cell lymphoma treated with dose-adjusted EPOCH-R. *Br J Haematol*. 2017;179(5):739-47.
  72. Atra A, Gerrard M, Hobson R, Imeson JD, Hann IM, Pinkerton CR. Outcome of relapsed or refractory childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma treated with the UKCCSG 9003/9002 protocols. *Br J Haematol*. 2001;112(4):965-8.
  73. Griffin TC, Weitzman S, Weinstein H, Chang M, Cairo M, Hutchison R, et al. A study of rituximab and ifosfamide, carboplatin, and etoposide chemotherapy in children with recurrent/refractory B-cell (CD20+) non-Hodgkin lymphoma and mature B-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;52(2):177-81.
  74. Kung FH, Harris MB, Krischer JP. Ifosfamide/carboplatin/etoposide (ICE), an effective salvaging therapy for recurrent malignant non-Hodgkin lymphoma of childhood: a Pediatric Oncology Group phase II study. *Med Pediatr Oncol*. 1999;32(3):225-6.
  75. Cairo MS, Shen V, Krailo MD, Bauer M, Miser JS, Sato JK, et al. Prospective randomized trial between two doses of granulocyte colony-stimulating factor after ifosfamide, carboplatin, and etoposide in children with recurrent or refractory solid tumors: a children's cancer group report. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001;23(1):30-8.
  76. Woessmann W, Zimmermann M, Burkhardt B, Meinhard A, Rosenbush C, Vailant V, et al. Relapsed or Refractory Burkitt Lymphoma in Children and Adolescents after BFM-Type First-Line Therapy - a BFM Group Report. [Abstract]. *Blood*. 2014;124:1738.
  77. Gross TG, Hale GA, He W, Camitta BM, Sanders JE, Cairo MS, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for refractory or recurrent non-Hodgkin lymphoma in children and adolescents. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(2):223-30.



PET: multiple localizzazioni profonde di DLBCL  
(Archivio di G. Lambertenghi Delilieri)

## Parole Chiave

Linfoma a grandi cellule B, età pediatrica, adolescenti, clinica, terapia.

## Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano il Dott. Marco Pizzi per il contributo dato alla preparazione del capitolo.

## Indirizzi per la corrispondenza

Marta Pillon

Telefono: 0039.0498213565

Fax: 0039.0498213510

E-mail: marta.pillon@unipd.it

*La rivista è consultabile sui siti web:*

Ematologia oncologica  
[www.ematologiaoncologica.it](http://www.ematologiaoncologica.it)

Fondazione Matarelli  
[www.fondazionematarelli.it](http://www.fondazionematarelli.it)

Società Italiana di Ematologia (SIE)  
[www.siematologia.it](http://www.siematologia.it)

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)  
[www.siesonline.it](http://www.siesonline.it)

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini  
[www.beat-leukemia.com](http://www.beat-leukemia.com)

*Nel prossimo numero: Anno 5 - Numero 2 - 2018*

## **Mielofibrosi**

Basi molecolari

Inquadramento diagnostico e classificazione

Modelli prognostici

Terapia farmacologica

Trapianto

*Con il supporto non condizionante di*

