

Università degli Studi di Napoli Federico II  
Dottorato di Ricerca in Morfologia Clinica e  
Patologica

*Coordinatore Prof.ssa S. Montagnani*

XXVIII Ciclo (2013-2016)



La deregolazione dell'apoptosi nei linfomi  
degli annessi oculari.

*Candidato*

*Dott. ssa Valentina Natella*

*Coordinatore*

*Prof. Gaetano De Rosa*

# INDICE

<b>Introduzione</b>	<b>pag. 3</b>
<b>Scopo</b>	<b>pag. 13</b>
<b>Materiali e Metodi</b>	<b>pag. 14</b>
<b>Risultati</b>	<b>pag. 20</b>
<b>Discussione</b>	<b>pag. 21</b>
<b>Tabelle</b>	<b>pag. 24</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag. 31</b>

# 1 INTRODUZIONE

## *1.1 Epidemiologia, aspetti clinici*

I linfomi rappresentano la neoplasia maligna più comune negli annessi oculari (congiuntiva, ghiandola lacrimale, orbita e palpebre) e costituiscono circa l'1-2% di tutti i linfomi non Hodgkin (NH) e il 5-15% di tutti i linfomi NH extranodali [1].

L'incidenza di tali linfomi secondo i dati del programma Surveillance Epidemiology and End Results è aumentata costantemente dal 1975 al 2001, con un incremento annuo pari a 6.3% [2].

In diverse serie, le lesioni linfoproliferative costituiscono dal 10 al 20% delle masse orbitarie ed i linfomi rappresentano la più comune lesione linfoproliferativa di questo distretto [3].

Descritti per la prima volta nel 1952 da Feinstein e Krause [4], i linfomi degli annessi oculari (OALs), nella maggior parte dei casi sono primitivi, e solo per il 10-30% secondari a malattia sistemica [5]. Vanno infine considerati i linfomi intraoculari (generalmente linfomi a grandi cellule B diffusi) che sono classificati nell'ambito dei linfomi del sistema nervoso centrale.

In Giappone e Corea la percentuale di linfomi tipo MALT risulta più alta (80-90%) rispetto ai paesi Occidentali [5].

Le sedi più colpite sono nell'ordine l'orbita (46-74%), la congiuntiva (20-33%), la ghiandola lacrimale (15-20%) e le palpebre (5-20%) [6].

La presentazione clinica varia in base alle strutture coinvolte dalla lesione linfoproliferativa.

Le lesioni congiuntivali si presentano generalmente come "salmon red patch", con gonfiore, arrossamento ed irritazione. Le lesioni orbitali sono caratterizzate da una massa palpabile (19%) che causa progressiva riduzione della vista e ptosi (6%), diplopia (2%), esoftalmo (27%).

Le forme che insorgono a livello della ghiandola lacrimale (nella porzione supero-anteriore dell'orbita) determinano un dislocamento verso il basso e medialmente del globo oculare. I linfomi insorti a livello palpebrale tipicamente si localizzano nel derma o nel muscolo orbicolare delle palpebre superiori, causando ptosi [5,6,7,8]

## 1.2 Istotipi

Più del 95% dei linfomi degli annessi oculari sono rappresentati da linfomi a cellule B e circa l'80% sono rappresentati da linfomi di basso grado. Solo l'1-3% dei linfomi degli annessi oculari hanno un immunofenotipo T cellulare [5,9], [Fig 1].

**Table 1.** Distribution of the types of ocular adnexal lymphoproliferative lesions in different series (%)

Reference	No. of patients	Marginal zone lymphoma	Follicular lymphoma	Mantle cell lymphoma	Diffuse large B-cell lymphoma	Chronic lymphocytic leukemia	Lymphoplasmocytic lymphoma	Acute lymphoblastic leukemia	Peripheral T-cell lymphoma	T-cell/NK cell lymphoma	Hodgkin lymphoma
Ferry et al. [40]	353	41	23	5	8	4	12	1	<1	<1	<1
Coupland et al. [40]	112	74	9	2	8		4			3	
Jaffe et al. [103]	46	72	2	4	15		4			2	
Coupland et al. [63]	230	59	12	3	13		4			3	
McKelvie et al. [40]	70	63	17	3	11	1				1	
Sullivan et al. [53]	69	56	22	1	7	6	4			4	
Sharara et al. [107]	17	47	12	18	18		6				
Mannami et al. [108]	43	86		2	12						
Nakata et al. [11]	44	77		4	14		2				
Cho et al. [109]	57	98	2								
White et al. [110]	42	38	29	7	19	2					
Fung et al. [46]	98	57	18	4	7						
Shields et al. [4]	117										
Bhatia et al. [49]	47	17	53		26						
Vegabhuti et al. [43]	48	69	21	2	4	2					
Plaisier et al. [35]	54	50	15	11	15						
Hatef et al. [13]	43	44	21	7	21	5				2	
Percentage range		17–98	2–53	2–18	4–26	2–6	2–12	1	<1	1–3	<1

Abbreviation: NK, natural killer.

**Figura 1** Distribuzione lesioni linfoproliferative degli annessi oculari. Ponzoni M.et al.[6]

Tra i linfomi primitivi degli annessi oculari, i più frequenti sono rappresentati dai linfomi della zona marginale del tipo MALT (55-60%), seguiti dai linfomi follicolari (19%), e dai linfomi B aggressivi (15-20%) che includono il linfoma a grandi cellule B diffuso e il linfoma mantellare. Rare, in queste sedi, sono le lesioni linfoproliferative T cellulari [6].

### MALT

I linfomi primitivi degli annessi oculari tipo MALT insorgono generalmente nella 5-7 decade di vita (età media 65 anni), con maggiore frequenza nel sesso femminile (rapporto maschi/femmine:1/1.5) [7], sebbene studi coreani e giapponesi indichino un'età più giovane (media 45 aa) e prevalenza nel sesso maschile [6].

Generalmente tali lesioni sono monolaterali ma la bilateralità si verifica nel 10-15% dei casi di cui 80% simultaneamente, il 20% come evento successivo. Raramente sono sintomatici nella loro fase iniziale e generalmente tra la comparsa dei sintomi e la diagnosi di malattia intercorre un periodo di 6-7 mesi in media (range:1mese-10 aa) [8].

Secondo la classificazione WHO i linfomi MALT sono definiti come linfomi extranodali costituiti da una popolazione B –cellulare morfologicamente eterogenea comprendente cellule centrocita-like, cellule monocitoidi, piccoli linfociti, sparsi

immunoblasti e cellule centroblasto-like [10]. La differenziazione in senso plasmocitoide può essere presente e tipicamente è più frequente (40%) nei linfomi MALT degli annessi oculari rispetto ai MALT di altre sedi [11]. Le cellule neoplastiche dalla zona marginale dei follicoli reattivi si estendono nella regione interfollicolare e tipicamente infiltrano i centri germinativi (colonizzazione follicolare) e, ove presenti, le strutture epiteliali formando complessi linfoepiteliali [12].

Dal punto di vista immunofenotipico tali linfomi possiedono un caratteristico profilo: CD20+, CD79a+, CD10-, CD23-, Bcl-6-, Bcl2-, CD5- (nel 95%) e ciclina D1-, con interspersi pochi linfociti T (CD3+) [8].

### *Linfoma Follicolare*

Il linfoma follicolare (FL) tipicamente colpisce pazienti più anziani (età media 60 anni), con storia di congiuntiviti recidivanti. Spesso coinvolge congiuntiva ed i tessuti orbitari, e rappresenta il più comune linfoma che interessa secondariamente gli annessi oculari [3,6].

Dal punto di vista morfologico, come per la controparte nodale, esso è costituito da cellule B centro-germinali (centrociti e centroblasti) con un pattern di crescita follicolare parziale, con il seguente immunofenotipo: CD20+, CD10+, bcl-6+, bcl2- [6,10].

### *Linfoma a grandi cellule B diffuso*

Il linfoma a grandi cellule B diffuso (DLBCL) colpisce più frequentemente il compartimento retro bulbare seguito da ghiandola lacrimale, palpebra e congiuntiva palpebrale. Può insorgere *de novo* o svilupparsi da un linfoma meno aggressivo (solitamente FL). Si tratta di un linfoma localmente aggressivo che spesso infiltra i tessuti adiacenti, l'osso e attraverso di esso anche il CNS [6,11].

Istologicamente è caratterizzato da linfociti B (CD20+) medio-grandi con aspetti anaplastici, centroblastici e immunoblastici, con figure mitotiche atipiche. L'indice mitotico varia dal 50 a 80% [6].

### *Linfoma mantellare*

Il linfoma mantellare (ML) colpisce soggetti più anziani (media 74 anni) e prevalentemente il sesso maschile. Alla diagnosi i pazienti hanno più frequentemente malattia disseminata, con interessamento bilaterale nel 71% dei casi [6,12].

Costituito da una popolazione monomorfa di cellule di piccola-media taglia centrocita-like, con profilo immunofenotipico CD20+,CD5+,CD10-,bcl2-, ciclina D1+ [3,10].

### *Linfomi T cellulari*

I rari linfomi primitivi oculari con immunofenotipo T cellulare si manifestano in età più precoce [ media 45 anni (range 26-65)], di essi il 62% ha interessamento concomitante dei seni nasali, il 37% ha malattia limitata all'orbita [6,13].

Originano generalmente da cellule NK o linfociti T citotossici, sono caratterizzati morfologicamente da necrosi, infiltrazione e distruzione della parete vascolare da parte di linfociti atipici con immunofenotipo CD2+, CD56+, CD3+(citoplasmatico), TIA-1+, granzyme B+. L'indice di proliferazione si attesta intorno a 60-70% [6].

### *1.3 Stadiazione e Trattamento*

Una corretta stadiazione della malattia è di fondamentale importanza per la gestione terapeutica del paziente. Essa richiede l'esecuzione di una biopsia osteomidollare, di una tomografia computerizzata total-body, e per i pazienti con DLBCL di una RMN cerebrale e della valutazione del liquido cerebrospinale [6].

In passato ha trovato largo impiego la stadiazione di Ann Harbor che prevede 4 stadi di malattia: interessamento di un singolo sito nodale o extranodale (Stadio I,IE); interessamento di due o più sedi linfonodali sovra o sottodiaframmatiche (Stadio II); interessamento dei linfonodi sovra e sotto diaframmatici±sedi extralinfatiche± milza o entrambi (Stadio III)e malattia disseminata (Stadio IV).

Circa i 2/3 dei pazienti con linfomi primitivi degli annessi oculari, al momento della diagnosi, si trovano in uno stadio IE.

Tale stadiazione però non tiene conto della multicentricità, della bilateralità della malattia, né della localizzazione anatomica che è associata ad una differente prognosi.

Pertanto nel 2009 è stato sviluppato un nuovo sistema TNM [Fig 2] per la stadiazione dei linfomi degli annessi oculari primitivi.

Lo stadio T suddivide lo Stadio IE di Ann Arbor in sottogruppi sulla base della sede della malattia, della bilateralità e multifocalità. N documenta l'interessamento nodale e M l'interessamento di siti distanti (ghiandole salivari, tratto gastrointestinale, polmone e fegato, e midollo osseo) [8].

TNM Clinical Staging for Ocular Adnexal Lymphomas (OALs) <sup>a</sup>	
Primary tumor (T)	
TX	Lymphoma extent not specified
T0	No evidence of lymphoma
T1	Lymphoma involving the conjunctiva alone without orbital involvement
T1a	Bulbar conjunctiva only
T1b	Palpebral conjunctiva ± fornix ± caruncle
T1c	Bulbar and nonbulbar conjunctival involvement
T2	Lymphoma with orbital involvement ± any conjunctival involvement
T2a	Anterior orbital involvement, <sup>b</sup> but no lacrimal gland involvement (± conjunctival disease)
T2b	Anterior orbital involvement with lacrimal gland involvement (± conjunctival disease)
T2c	Posterior orbital involvement (± conjunctival involvement ± any extraocular muscle involvement)
T2d	Nasolacrimal drainage system involvement (± conjunctival involvement but not including nasopharynx)
T3	Lymphoma with preseptal eyelid involvement <sup>23,c</sup> ± orbital involvement ± any conjunctival involvement
T4	Orbital adnexal lymphoma extending beyond orbit to adjacent structures, such as bone and brain
T4a	Involvement of nasopharynx
T4b	Osseous involvement (including periosteum)
T4c	Involvement of maxillofacial, ethmoidal ± frontal sinuses
T4d	Intracranial spread
Lymph node involvement (N) <sup>d</sup>	
NX	Involvement of lymph nodes not assessed
N0	No evidence of lymph node involvement
N1	Involvement of ipsilateral regional lymph nodes <sup>d</sup>
N2	Involvement of contralateral or bilateral regional lymph nodes
N3	Involvement of peripheral lymph nodes not draining ocular adnexal region
N4	Involvement of central lymph nodes
Distant metastasis (M)	
MX	Dissemination of lymphoma not assessed
M0	No evidence of involvement of other extranodal sites
M1	Lymphomatous involvement in other organs recorded either at first diagnosis or subsequently
M1a	Noncontiguous involvement of tissues or organs external to the ocular adnexa (eg, parotid glands, submandibular gland, lung, liver, spleen, kidney, breast)
M1b	Lymphomatous involvement of the bone marrow
M1c	Both M1a and M1b involvement

Figura 2 TNM clinical staging of primary ocular adnexa lymphoma. AJCC Cancer staging Manual, 7th ed, 2009

Il trattamento dei linfomi degli annessi oculari dipende da variabili legate al paziente (età, presenza di disturbi autoimmuni) e alla malattia (sede, stadio, accessibilità chirurgica) ed, ovviamente dall'istotipo [Fig.3].

Il trattamento chirurgico è considerato il più appropriato per i linfomi congiuntivali o della ghiandola lacrimale in Stadio I.

Nei pazienti più anziani con malattia asintomatica l'approccio più seguito è il "Watch and Wait" associato ovviamente ad un accurato follow-up.

La radioterapia consente un buon controllo della malattia indipendentemente dall'istotipo del linfoma, e si associa ad un indice di ricorrenza tra 0 e 15%, pertanto è la scelta di riferimento soprattutto per le forme localizzate all'orbita e nelle escissioni incomplete.

Tuttavia essa si associa a complicanze a breve (reazioni cutanee e congiuntivali) e lungo termine (cataratta nel 30-50% e xerofthalmia nel 20-40%)[5].

Altri approcci terapeutici sono rappresentati dalla chemioterapia, generalmente utilizzata nei pazienti con interessamento sistemico; dalla più recente immunoterapia con IFN-alfa e Rituximab; ed infine dalla terapia antibiotica; ma gli studi condotti finora hanno mostrato risultati discordanti [7].

**Table 2.** Therapeutic management of non-Hodgkin lymphomas involving the ocular adnexa

Therapy	Follicular lymphoma	Diffuse large B-cell lymphoma	Mantle cell lymphoma	Indolent B-cell	Aggressive B-cell	T-cell lymphoma	NK-cell lymphoma
Treatment	RT	R-CT + RT	Frail patients: RT; fit patients, R-CT + HD-ARA-C + ASCT	WAW or local therapy	R-CT ± ASCT	CT ± ASCT	CT ± ASCT
Orbit irradiation	Curative, <sup>b</sup> palliative	Consolidation, palliative	Curative, <sup>b</sup> palliative	Curative, <sup>b</sup> palliative	Consolidation, palliative	Consolidation, palliative	Consolidation, palliative
CNS prophylaxis <sup>a</sup>	No	IT-MTX ± IV HD-MTX	No	No	IT-MTX ± IV HD-MTX	IT-MTX ± IV HD-MTX	IT-MTX ± IV HD-MTX
Relapsed patients	RIT, WAW	ASCT	ASCT or allogeneic	R-CT	ASCT or allogeneic	ASCT or allogeneic	Allogeneic

<sup>a</sup>CNS prophylaxis should be delivered according to individual risk.

<sup>b</sup>Radiotherapy delivered with curative intent is usually indicated as exclusive treatment.

Abbreviations: ASCT, autologous stem cell transplant; CT, chemotherapy; HD-ARA-C, high-dose cytarabine; IT-MTX, intrathecal methotrexate; IV HD-MTX, intravenous high-dose methotrexate; NK, natural killer; R, rituximab; RIT, radioimmunotherapy; RT, radiotherapy; WAW, watch and wait.

**Figura 3** Management terapeutico dei linfomi NH degli annessi oculari. Ponzoni M, et al [6]

### 1.4 Prognosi

L'istotipo influenza la sopravvivenza a 4 anni che risulta pari al 95% per i linfomi MALT, 65% per i follicolari, 50% per i DLBCL e 0% per i pazienti con linfoma NK e mantellari [14].

Aspetti associati ad una prognosi più favorevole sono: malattia limitata, buon performance status, assenza di sintomi sistemici. Al contrario influenzano negativamente la prognosi: lo stadio avanzato di malattia, l'età tra 60-64 anni, l'interessamento nodale, elevato livello di LDH.

Anche il sito di malattia influenza la prognosi, il rischio più basso di interessamento sistemico è per i linfomi congiuntivali (20%), orbita (35%), ghiandola lacrimale (50%), palpebra (75%) [8].



## 1.5 Patogenesi

Molteplici sono i processi coinvolti nella patogenesi dei linfomi degli annessi oculari. Si ritiene che una stimolazione antigenica cronica (che consentirebbe l'acquisizione di tessuto linfoide organizzato normalmente non presente in queste sedi) conduca ad una espansione clonale e proliferazione di cellule B. L'intervento di mutazioni puntiformi o alterazioni cromosomiche attraverso l'attivazione di oncogeni, la inattivazione di geni tumor-suppressor, causerebbe l'alterazione dei meccanismi di crescita e differenziazione cellulare e di apoptosi.

Un aumentato rischio di sviluppare linfomi degli annessi oculari è stato in effetti riportato in pazienti con disturbi autoimmuni: artrite reumatoide, sindrome di Sjogren, lupus eritematoso sistemico, tiroidite di Hashimoto [1].

Vari studi hanno, inoltre, dimostrato una elevata prevalenza di agenti infettivi nei pazienti affetti da tali neoplasie.

In special modo per i linfomi marginali tipo MALT è stata ipotizzata una correlazione con l'infezione di *Chlamydia psittaci* (Cp) [8,15,16] [Fig4].

Uno studio italiano ha dimostrato, attraverso tecniche immunoistochimiche e di PCR, la presenza di DNA di Cp in 87% in una serie di linfomi MALT degli annessi oculari nel Nord Italia; e una risposta positiva di tali lesioni al trattamento con doxyciclina [16]. Simili risultati sono stati riportati in Corea ma non in studi condotti negli Usa, Francia, Giappone, Africa, Italia centrale, suggerendo che oltre ad una estrema variabilità nella infezione da Cp e nella sua associazione con tali linfomi, altri fattori eziologici siano coinvolti nei meccanismi patogenetici [15].

Sieropositività per HCV è stata individuata nel 13% dei pazienti con OAML e sembra essere associata ad una maggiore aggressività e disseminazione della malattia [17].

Relativamente ad altri istotipi di linfomi degli annessi oculari, l'infezione da Cp è stata messa in relazione soprattutto con linfomi a grandi cellule B diffusi, ed in pochi casi con linfomi follicolari e mantellari [6]; mentre infezione da Epstein-Barr virus è stata individuata in pazienti con linfomi NK/T cellulari [18].

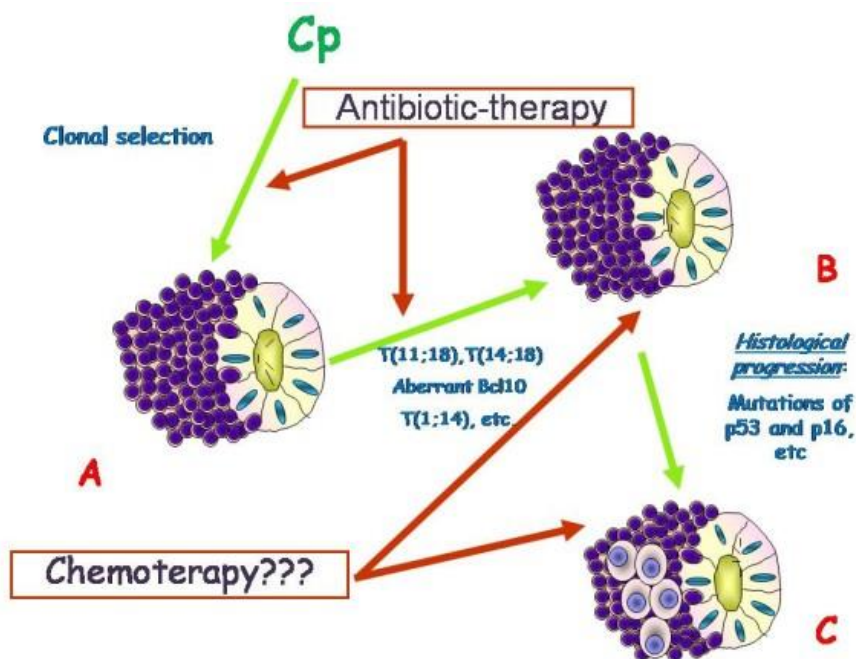


Figura 4 Progressione biologica OAML, Collina et al. [15]

### 1.6 Anomalie cromosomiche

Alcune traslocazioni cromosomiche sono state descritte nei linfomi MALT extranodali, con frequenza variabile in base alle sedi coinvolte. Esse sono t(11;18) (q21;q21)/API2-MALT1, t(1;14) (p22; q23)/IGH-BCL10, t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1 e t(3;14) (p14;q32)/IGH-FOXP1.

Mentre le prime tre sembrano essere traslocazioni “esclusive” dei MALT, la traslocazione t(3;14) è stata descritta anche in altri linfomi B cellulari [7,19].

La traslocazione più comunemente associata ai linfomi degli annessi oculari MALT-type (prevalenza 24-38%) è t(14;18) (q32;q21)/IGH-MALT1. Essa giustappone il gene MALT1 e il promoter IgH sul cromosoma 14 inducendo una espressione costitutiva, incontrollata, di MALT1 [20,21,22]. Sebbene largamente descritta nei linfomi MALT essa è stata individuata anche in rari casi di linfomi a grandi cellule B diffusi extranodali [23] e nel 70-95% dei linfomi follicolari [6].

Un caratteristico aspetto di tale traslocazione è che si accompagna spesso ad una trisomia del cromosoma 3 [20].

La t(11;18) si osserva più frequentemente nei linfomi MALT gastrici (10-50%) e polmonari, mentre è riportata negli annessi oculari con una frequenza compresa tra 2,7 e 20% [8,21] e giustappone il gene API2 (apoptosis inhibitor-2) al gene MALT1 creando una proteina chimerica di fusione.

La t(1;14) è presente in meno del 5% dei linfomi MALT e giustappone il gene Bcl10 al gene IgH promoter portando alla espressione costitutiva di Bcl-10. Bcl 10 è una proteina intracellulare essenziale per lo sviluppo e la funzione delle cellule B e T mature [8].

La t(3;14)(p14;q32) è stata individuata nei linfomi MALT della tiroide (50%), degli annessi oculari (20%) e cutanei (10%), essa porta ad una overespressione della proteina FOXP1 che agirebbe come soppressore di più geni proapoptotici, reprimendo l'apoptosi caspasi-dipendente [24,25].

I prodotti delle traslocazioni t(1;14), t (14;18) e t (11;18) agiscono tutti attraverso la attivazione del pathway di NFkB.

NF-kappa B (nuclear factor-kappa B, NF-kB) è una famiglia di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria alle infiammazioni.

Normalmente NF kB è presente nella sua forma inattiva a livello citoplasmatico, legato al complesso inibitore Ikb.

Fisiologicamente dopo la stimolazione antigenica CARD11/CARMA1 recluta Bcl10 il quale lega il dominio Ig-like di MALT1 inducendone la oligomerizzazione ed attivazione. MALT1 nella sua forma attiva lega TRAF6 inducendone la oligomerizzazione. Il complesso CARD11-BCL10-MALT1-TRAF6 promuove la ubiquitinazione di IKK $\gamma$  con conseguente fosforilazione di Ikb, rilascio di NF-kB che trasloca nel nucleo dove esso agisce come fattore di trascrizione su una serie di geni coinvolti nella proliferazione, dell'apoptosi e dell'attivazione, sviluppo e sopravvivenza cellulare.

Pertanto si comprende come la overespressione di BCL10, MALT1 e della proteina chimerica API2-MALT1 conduca ad una attivazione aberrante di NFkB [26,27].

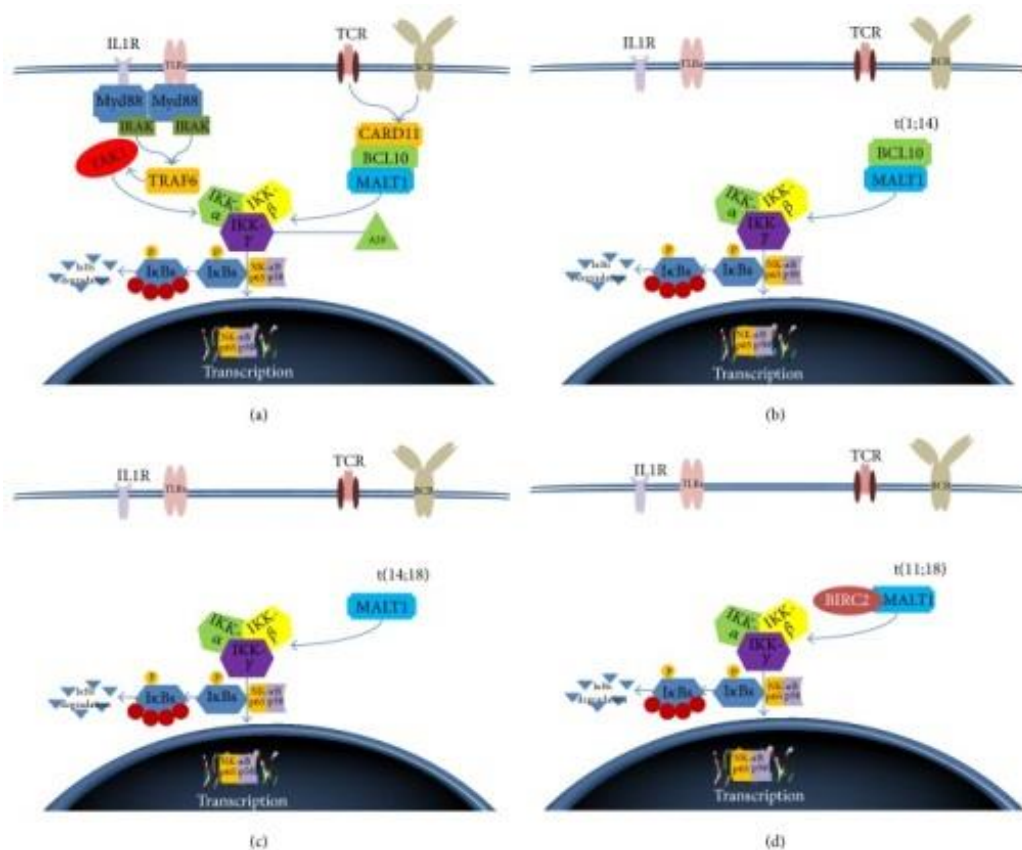


Figura 5 attivazione del pathway di NFκB, Troppan K [26]

Studi citogenetici hanno inoltre dimostrato che i linfomi MALT degli annessi oculari negativi per la t(11;18), presentano frequentemente le trisomie dei cromosomi 3 e 18 (rispettivamente 38-62% dei pazienti e 13-47% dei pazienti) [28,29].

In particolare i OALs che presentano trisomia 18 sembrano avere delle caratteristiche clinicopatologiche distinte: interessamento della congiuntiva, maggiore incidenza in giovani (<50 anni) donne ed alto indice di recidiva [28].

La trisomia del 3 al contrario è significativamente meno comune nelle forme congiuntivali rispetto ai linfomi orbitali (12 vs 81%) Variabilità geografiche nella incidenza di anomalie citogenetiche sembrano comunque sussistere confrontando studi americani ed europei [7].

Recentemente un altro meccanismo per l'attivazione incontrollata di NFκB nei linfomi MALT, particolarmente negli annessi oculari, ghiandole salivari e tiroide, è stato individuato nella inattivazione di A20 (TNFAIP3), inibitore globale di NFκB, attraverso la delezione della banda cromosomica 6q23, o attraverso mutazioni somatiche [30,31,32].

## **SCOPO**

Lo scopo del progetto è stato quello di indagare la biologia dei linfomi degli annessi oculari, con particolare interesse al ruolo di molecole coinvolte nei meccanismi di apoptosi, e di valutarne la relazione con l'istotipo e con l'andamento della malattia.

## MATERIALI E METODI

### *Popolazione studio*

Sono stati selezionati dall'Archivio della Sezione di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell'Università "Federico II" di Napoli, 83 casi di linfomi degli annessi oculari diagnosticati tra il 2000 e il 2013 ( M 40, F 43; età media dei pazienti: 63,7 anni; range 30-89 anni).

Nella nostra casistica la sede più colpita è risultata l'orbita 68/83 casi (82%), seguita da ghiandola lacrimale 11/83 casi (13,2 %) e da congiuntiva 1/83 casi (1,2%). Nessun caso aveva come sede la palpebra, mentre tre casi erano multifocali al momento della diagnosi: 1 caso orbita+ ghiandola lacrimale (1,2%), 1 caso orbita+palpebra (1,2%), 1 caso orbita+congiuntiva (1,25).

L'istotipo più frequente è stato il marginale extranodale MALT-type 56/83 casi (64%), seguito dal linfoma a grandi cellule B diffuso 8/83 (10%), dal linfoma follicolare (4%) e mantellare (4%). I rimanenti 13 casi comprendono vari istotipi ( 1 linfoma tipo Burkitt, 1 linfoma a cellule NK/T, 1 linfoma T, 3 casi di linfoma linfoplasmacitico, 3 casi di linfomi a piccole cellule B, e 4 forme di linfomi B cellulari non sottoclassificati).

Al momento della stesura del lavoro, avevamo a disposizione il follow-up (range 5-108 mesi) di soli 39 pazienti, di cui 14 (36%) avevano presentato ripresa di malattia. Durante il follow-up 6 (15%) pazienti erano deceduti, 9 (23%) erano vivi con malattia, i restanti 24 (62%) erano vivi e liberi da malattia.

Tutte le caratteristiche cliniche e morfologiche della popolazione in esame sono riportate nella Tabella 1.

Per ogni caso avevamo a disposizione un blocchetto in paraffina relativo alla biopsia chirurgica.

### *Tissue\_Microarray*

Per ciascun campione è stata selezionata l'inclusione più rappresentativa e sono state individuate le aree di interesse, sono stati , prelevati, mediante un ago sottile, cilindri di tessuto di 0.6 mm di diametro, da campioni inclusi in paraffina. I campioni "donatori" sono stati ulteriormente inclusi in un altro, unico, blocchetto di paraffina utilizzando un costruttore di tissue microarray semi-automatico, ottenendo così 3 TMAs contenenti 83 casi.

Sulle sezioni ottenute dal taglio al microtomo, sono state eseguite colorazione ematossilina/eosina, analisi FISH per la valutazione della delezione del locus 6q23.3, analisi immunohistochemica per valutare l'espressione di A20, p-NF-kB p65 (RelA), c-Myc.

### *Immunohistochemica*

Sulle sezioni dei tre TMAs sono state eseguite indagini di immunohistochemica per valutare l'espressione di A20, p-NF-kB p65 (RelA), c-Myc.

Una volta tagliate, le sezioni sono state deparaffinate in xilene, e reidratate mediante scala discendente di alcool fino all'acqua distillata deionizzata. L'attività della perossidasi endogena è stata inibita con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% per 30 minuti. Successivamente le sezioni sono state trattate con siero bovino diluito all'1% in PBS (phosphate buffered saline, tampone fosfato salino) per 30 minuti allo scopo di minimizzare le reazioni aspecifiche.

A questo punto è stata effettuata l'incubazione con i seguenti anticorpi: A20, p-NF-kB p65 (RelA), c-Myc.

Il legame dell' anticorpo primario con l'antigene, viene visualizzato mediante un metodo di rilevazione indiretto che fa uso del sistema biotina-streptavidina. Si effettua incubazione per 30 minuti con Novocastra Biotinylated Secondary Antibody (RE7103), una formulazione di Ab secondari coniugati con biotina, che riconosce le immunoglobuline di topo o di coniglio e viene impiegato per determinare qualsiasi Ab primario legato ai tessuti. Successivamente, si applica per 30 minuti Novocastra Streptavidin-HRP (RE7104), un coniugato streptavidina-perossidasi di rafano (HRP), che si lega alla biotina presente sull' anticorpo secondario.

Le incubazioni sono effettuate con circa 100µl di anticorpo e seguite da lavaggio in tampone TBS/Tween (2 passaggi di 5 minuti ognuno).

Le sezioni sono state poi incubate con circa 100µl di substrato cromogeno (DAB, 3,3'-Diaminobenzidina e acqua ossigenata al 2,5-3%) e lasciate incubare per 5 minuti al buio. A ciò ha seguito il lavaggio con acqua distillata per circa 5 minuti per eliminare l'eccesso di DAB. La reazione con la perossidasi produce un precipitato visibile di colore marrone in corrispondenza del sito antigenico.

Dopo un debole contrasto nucleare con ematossilina, le sezioni sono state poi montate con un mezzo sintetico (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany).

Per la valutazione immunoistochimica di c-Myc, in accordo a quanto riportato in letteratura [33], abbiamo utilizzato un valore cut-off di cellule immunocolorate  $\geq 30\%$  per definire la positività del caso.

Riguardo la determinazione di A20 sono pochi i lavori presenti in letteratura [34,35] e non esistono dei valori standardizzati da utilizzare nella valutazione immunoistochimica su campione istologico di linfoma. I valori soglia utilizzati sono stati, pertanto, stabiliti dall'Operatore, sulla base della casistica analizzata. Il segnale citoplasmatico è stato definito secondo il seguente score : 0 assente, 1 debolmente positivo in  $>30\%$  delle cellule , 2 moderatamente positivo in  $>30\%$  delle cellule, 3 fortemente positivo in  $> 30\%$  delle cellule. Quindi sono stati considerati positivi i casi con score 2-3, negativi quelli con score 0-1.

Nella valutazione di p-NF-kB p65 (RelA) è stato considerato positivo un segnale nucleare. Per ogni caso è stata valutata la percentuale di cellule neoplastiche positive sul totale e definita positiva quando  $\geq 20\%$ .

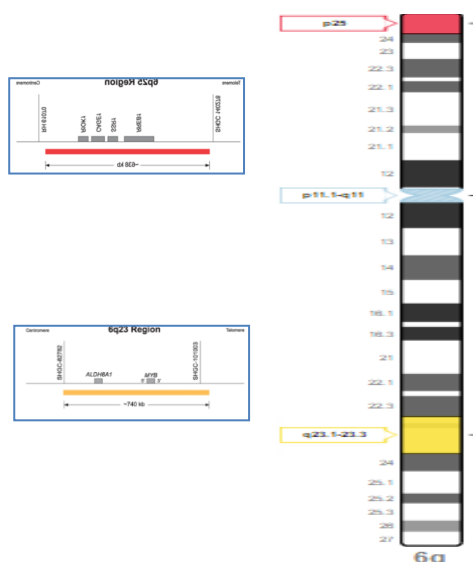
### *FISH*

Prima di procedere alla reazione di ibridazione, le sezioni di TMA sono state lasciate per 12 ore in stufa a 60° C in modo da favorire il successivo step di de-paraffinatura. Le sezioni sono state de-paraffinate in due passaggi in xylene al 100% per 10 minuti ciascuno. I vetrini sono stati trattati con 0.3 M di cloruro di sodio e 0.03 M di citrato di sodio per 20 min a 80° C e successivamente immersi nella soluzione con proteasi (Proteinasi K Solution, PathVysion, VYSIS) portata a 37° C per 10 minuti.

Per valutare la delezione del locus 6q23.3 è stata utilizzata la sonda tri color FISH Probe (Vysis), composta da una sonda LSI di circa 740Kb che riconosce la regione 6q23.3 (Gold), una sonda centromerica di circa 430Kb (Aqua) ed una sonda LSI di circa 830Kb che riconosce la regione 6p25 (Texas Red) [Fig 6]



## Cromosoma 6



**Figura 6** Rappresentazione schematica delle sonde FISH Vysis utilizzate per la valutazione del locus 6p25, 6q23

Il mix di sonde utilizzate consta di una sonda locus specifica 6q23,3 di circa 740 Kb marcata con fluorocromo Gold, che permetterà la visualizzazione del locus nel quale è mappato il gene A20 su una coppia di cromosomi omologhi, una sonda centromerica di circa 430 Kb marcata con fluoro cromo Aqua che ibrida con un tipo di sequenze ripetute, dette alfoidi, specifiche del centromero del cromosoma 6 e un'altra sonda locus specifica 6p25 di circa 830 Kb marcata con fluorocromo Red, che permetterà la visualizzazione del locus nel quale è mappato il gene RREB1 su una coppia di cromosomi omologhi.

Non è presente in letteratura alcuna informazione circa i valori soglia da utilizzare per la valutazione della delezione di A20 su campione istologico di linfoma. I valori soglia utilizzati sono stati stabiliti dall'Operatore, sulla base della casistica analizzata. La percentuale di positività indicata nasce come la mediana dei valori ottenuti dalla lettura dei campioni analizzati.

Ai fini dell'adeguatezza del campione, la conta dei segnali ha previsto la valutazione di almeno 30 nuclei tumorali. All'interno della nostra casistica sono stati valutati 3 parametri [Fig 7] di seguito riportati:

- Numero di cellule contate
- Numero medio di segnali Gold, CEP6, Red
- Ratio Gold/CEP6

Sulla base di questi parametri è possibile suddividere le alterazioni in 4 gruppi :

1. Disomico: 2 segnali Gold, 2 segnali CEP6, 2 segnali Red, Ratio =1 nel 95% delle cellule tumorali analizzate;
2. Delezione tipica: numero segnali Gold pari a 1 o ratio <1 in più del 15% delle cellule tumorali analizzate e 2 segnali Red;
3. Delezione atipica: numero copie Gold pari a 1, ratio =1, numero di copie segnale Red 1 in più del 20% delle cellule tumorali analizzate;
4. Polisomia: numero segnali Gold Aqua e Red > 3 indipendentemente dalla Ratio > 2 in più del 15% delle cellule tumorali analizzate.

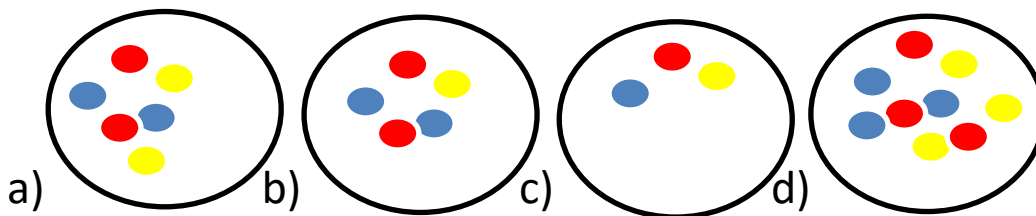


Figura 7 Rappresentazione schematica dei diversi pattern a)Disomico b)Delezione tipica c)Delezione Atipica d)Aumento del numero di copie del cromosoma 6

### *Analisi statistica*

La correlazione tra le variabili del nostro studio ed in particolare tra l' espressione dei marcatori testati e le varie caratteristiche cliniche e patologiche esaminate, è stata valutata mediante test del chi quadro. Sono stati considerati significativi valori di  $p < 0,05$ .

Le curve relative al tempo libero da malattia e di sopravvivenza sono state generate con il metodo di Kaplan Meyer; la significatività statistica delle curve è stata calcolata mediante log- rank test.

Tutte le analisi statistiche sono state ottenute utilizzando il pacchetto software SPSS.

## Risultati

### *Espressione di c-Myc*

Tutti i casi di OALs valutabili (71) non hanno mostrato significativa ( $\geq 30\%$ ) positività nucleare alla colorazione immunohistochimica con c-Myc, pertanto sono stati considerati negativi .

### *Espressione di p-NF-kB p65 (Rel A)*

p-NF-kB p65 (Rel A) è risultato positivo in 39 casi su 67 valutabili (58,2%), dei 28 casi negativi 19 (68%) erano linfomi marginali, 3 (11%) erano DLBCL, i rimanenti casi erano 2 linfomi B a piccole cellule, 1 fFL, 1 ML, 1 linfoma a cellule T e 1 linfoma di Burkitt.

### *Espressione di A20*

La proteina A20 è stata valutata in 65 casi ed è risultata positiva in 15 casi (23%), di cui 10 linfomi marginali (66,7%), 2 DLBCL (13,3%), 1 FL, 1 linfoma a cellule T, 1 linfoma T/NK.

### *FISH Cr6*

Su 72 casi valutabili, la delezione dell'intero braccio del cromosoma 6q, definita *atipica*, è stata individuata in 16 casi (22,2%), la delezione del locus in cui mappa A20 (*tipica*) è stata osservata in 10 casi (13,9%), un "gain" è stato individuato in 9 casi (12,5%), normali sono risultati 37 (51,4%).

Tutti i risultati ottenuti sono schematizzati nella Tabella 2.

Le correlazioni tra le espressioni dei marcatori più significativi, i risultati FISH e i dati clinico-patologici sono riportate nelle Tabelle 3-4-5.

Le immagini relative alla valutazione immunohistochimica sono raccolte nella Figura 8.

Le immagini relative alla valutazione FISH delle anomalie del cromosoma 6 sono raccolte nella Figura 9.

## DISCUSSIONE

I linfomi primitivi degli annessi oculari sono una patologia relativamente rara (5-15% di tutti i linfomi NH extranodali) ma con un aumento di incidenza pari a 6.2% e 6.5% rispettivamente tra uomini e donne [2]. Questi dati possono essere solo parzialmente giustificati dall'acquisizione di più recenti classificazioni dei linfomi e dai più efficienti approcci diagnostici.

Nella Nostra Istituzione Federico II, in uno studio retrospettivo su 2,480 lesioni occupanti spazio dell'orbita, raccolte negli anni 1976-2011, il 12 % (291) sono risultati linfomi Non-Hodgkin, che anche nella nostra casistica rappresenta la neoplasia più comune (291 su 783, 37%) [36].

Nonostante il crescente interesse verso queste patologie "emergenti", gli studi condotti sinora hanno solo in parte svelato i meccanismi patogenetici che ne sono alla base.

Ampio riscontro è stato dato alla attivazione costitutiva del pathway di Nf-kB.

NF-kB (nuclear factor-kappa B) è una famiglia di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria e nella sopravvivenza cellulare. Essa comprende cinque membri RelA (p65), RelB e c-Rel, p50 e p52, variamente combinati tra loro in omodimeri ed eterodimeri.

Nella forma inattiva p50/RelA e RelB sono legati proteine inibitrici, rispettivamente IκB e p100, a livello citoplasmatico.

Il complesso NF-kB può essere attivato attraverso due vie, una canonica ed una non canonica.

Il pathway canonico è attivato da citochine come TNFα e IL-1 o da agenti microbici e passa attraverso il reclutamento del complesso IκB kinase (IKK) che fosforilando IκB libera il complesso p50/Rel A che entra nel nucleo attivando così la trascrizione.

Il pathway non canonico è attivato dalla stimolazione da parte di fattori appartenenti alla famiglia dei fattori di necrosi tumorale (TNF) ed agisce attraverso l'attivazione dell'omodimero IKKα che fosforila il dominio C-terminale di p100 con produzione di una nuova proteina (p52) e formazione del complesso p52/RelB che trasloca a livello nucleare ed attiva il processo di trascrizione [37].

L'attivazione costitutiva di NF-kB avviene nei linfomi MALT solitamente attraverso la via canonica in seguito alla overespressione di Bcl-10, MALT-1 e API2/MALT1.

Alla base di tale overespressione sono alcune traslocazioni cromosomiche variamente presenti nei linfomi MALT di diverse sedi [t(11;18) (q21;q21)/API2-

MALT1, t(1;14) (p22; q23)/IGH-BCL10, t(14;18)(q32;q21)/IGH-MALT1 e t(3;14) (p14;q32)/IGH-FOXP1].

Negli ultimi anni particolare interesse è stato rivolto al ruolo del gene A20 (TNFAIP3), inibitore globale di NFκB, nella patogenesi dei linfomi MALT in particolar modo del distretto oculare.

TNFAIP3/A20 è un potente inibitore “*globale*” del pathway di NF-κB, nello specifico esso agisce attraverso la deubiquitinazione ed inattivazione di TRAF6, molecola coinvolta nel downstream del complesso CARMA1-Bcl10\_MALT1.

Delezioni del gene A20 e sue mutazioni somatiche, causandone la inattivazione, sarebbero pertanto responsabili di una incontrollata attivazione di NF-κB.

Il gene TNFAIP3/A20 è stato individuato da studi di ibridizzazione genomica comparativa come target della delezione 6q23.3 in una serie di casi di linfomi degli annessi oculari, traslocazione negativi. I locus di TNFA, TNFB, TNFC (citochine pro-infiammatorie e potenti attivatori di NF-κB), rappresenterebbero invece il target di “*gains*” di 6p21.2-6p22.1 [38].

In realtà le regioni di 6q interessate dalle delezioni sono relativamente grandi ed eterogenee e pertanto l'individuazione dei geni targets è ancora lontana dall'essere completa [39]

Nel Nostro lavoro abbiamo utilizzato un mix di sonde FISH per il locus specifico 6q23,3 (ove mappa il gene A20), per il centromero del cromosoma 6 e per il locus 6p25 (ove mappa il gene RREB1).

La delezione del cromosoma 6 è stata riscontrata in 17 casi (11 casi a carico dell'intero braccio e in 6 casi a livello del locus di A20) e non è risultata specifica dell'istotipo marginale, né ha mostrato associazione con una particolare sede.

Il primo risultato è in accordo con i dati già presenti in letteratura, in cui la delezione del cromosoma 6 è riportata in caso di linfomi Non-Hodgkin di vario istotipo, che di linfomi di Hodgkin, e con una frequenza variabile dal 7 al 42% in base al tipo istologico e alla metodica usata per l'analisi [39].

Per quanto riguarda invece l'associazione con la sede, alcuni Autori [38] riportano al contrario dei nostri risultati, un più frequente coinvolgimento dei tessuti molli orbitari nei pazienti con delezione di A20.

La delezione del cromosoma 6 statisticamente è risultata associata alla bassa/nulla espressione proteica della proteina A20, come atteso, e questo dato convaliderebbe la valutazione mediante tecnica immunoistochimica, almeno come primo step, di una mutazione a carico del locus di A20.

Inoltre, dai nostri dati si evidenzia un trend di associazione statistica positiva tra la bassa espressione proteica di A20 e la sopravvivenza libera da progressione (PFS) [Figura 10].

In letteratura è riportato che la delezione di A20 è associata significativamente ad, ad una maggiore frequenza di multifocalità e diffusione della malattia e ad una più breve sopravvivenza libera da malattia [38].

Per quanto riguarda invece la espressione proteica di p-NF-kB p65 (Rel A), non abbiamo riscontrato una associazione statisticamente significativa né con la delezione del cromosoma 6q, né con l'espressione proteica di A20. Questo dato può essere spiegato dall'ampiezza dei loci genici testati e dal possibile coinvolgimento nella delezione di altri geni target che potrebbero agire con un meccanismo differente da quello già noto sul pathway di NF-kb.

Da quanto esposto risulta che la delezione del cromosoma 6 può essere un evento chiave nel processo patogenetico dei linfomi degli annessi oculari (MALT e non), e può essere predittiva di una maggiore aggressività della malattia.

L'impiego della metodica immunohistochimica per la valutazione della proteina A20 potrebbe rappresentare un valido strumento, di più facile esecuzione, per la ricerca di una espressione difettosa di A20; ed un ausilio a metodiche più complesse e costose di biologia molecolare.

Restano da indagare i possibili ulteriori geni target della delezione, la funzione del loro prodotto proteico sui meccanismi di apoptosi e progressione del ciclo cellulare, oltre alla possibile associazione con altri parametri clinici.

# Tabella 1

Caso N.	Età	Sesso	Sede	Diagnosi	Follow-up (5-108 M)
1	46	m	Orbita	Marginale	NA
2	69	m	Orbita	Marginale	NA
3	65	f	Orbita	Marginale	NA
4	71	m	Congiuntiva	marginale	NA
5	72	f	Orbita	marginale	NA
6	71	f	Orbita	marginale	A
7	82	m	Orbita	DLBCL	NA
8	60	m	Gh. lacrimale	marginale	R,AWD
9	80	m	Orbita	marginale	R,AWD
10	38	m	Gh. lacrimale	marginale	A
11	73	f	Orbita	Piccole cell. B	NA
12	79	m	Orbita	DLBCL	NA
13	53	f	Gh. lacrimale	DLBCL	R,AWD
14	60	m	Orbita	FL	NA
15	45	f	Orbita	marginale	R,AWD
16	87	m	Orbita	marginale	NA
17	64	f	Orbita	marginale	A
18	57	m	Orbita	marginale	NA
19	65	m	Orbita	ML	NA
20	75	m	Congiuntiva+Orbita	marginale	NA
21	48	f	Orbita	Linfoplasmacitico	NA
22	58	m	Orbita	B NOS	NA
23	61	f	Orbita	marginale	NA
24	58	f	Orbita	marginale	D
25	63	f	Orbita	Piccole cell. B	R,D
26	77	f	Orbita	marginale	NA
27	69	m	Orbita	ML	A
28	79	m	Orbita	marginale	NA
29	71	m	Orbita	B NOS	NA
30	79	m	Orbita	marginale	NA
31	78	f	Gh. lacrimale	marginale	A
32	71	f	Orbita	FL	D
33	78	f	Orbita	Burkitt	D
34	63	f	Orbita	marginale	R,AWD
35	72	f	Gh. lacrimale	DLBCL	R,AWD
36	83	m	Orbita	ML	D
37	75	m	Gh. lacrimale	DLBCL	NA
38	37	f	Orbita	marginale	A
39	57	f	Palpebra+Orbita	marginale	A
40	71	f	Orbita	B NOS	NA
41	47	m	Orbita	Piccole cell. B	NA
42	33	m	Orbita	marginale	NA
43	62	m	Orbita	marginale	NA
44	83	m	Orbita	marginale	NA
45	76	f	Orbita	Linfoplasmacitico	NA
46	60	m	Orbita	marginale	NA
47	44	f	Orbita	marginale	NA
48	45	f	Orbita	marginale	R,AWD
49	73	m	Orbita	marginale	NA
50	61	m	Orbita	FL	R,AWD
51	53	m	Gh. lacrimale	marginale	R,AWD
52	80	m	Orbita	marginale	NA
53	44	f	Orbita	marginale	A
54	76	f	Orbita	marginale	NA
55	71	f	Orbita	DLBCL	NA
56	67	f	Orbita	DLBCL	NA
57	66	m	Orbita	marginale	NA
58	63	m	Orbita	DLBCL	NA
59	56	f	Orbita	B NOS	A
60	79	f	Orbita	marginale	NA
61	83	m	Orbita	marginale	NA
62	49	f	Orbita	marginale	NA



63	81	f	Orbita	marginale	NA
64	70	f	Orbita	marginale	A
65	89	f	Orbita	T	NA
66	44	m	Orbita	T/NK nasal-type	NA
67	48	f	Orbita	Linfoplasmacitico	NA
68	52	m	Orbita	marginale	A
69	41	f	Orbita+Gh. Lacrimale	marginale	NA
70	58	m	Orbita	marginale	A
71	67	f	Orbita	marginale	A
72	74	f	Orbita	marginale	R,A
73	76	f	Orbita	marginale	R,A
74	55	f	Gh. lacrimale	marginale	A
75	46	m	Orbita	marginale	A
76	78	f	Gh. lacrimale	marginale	A
77	30	f	Gh. lacrimale	marginale	A
78	77	m	Orbita	marginale	A
79	70	m	Orbita	marginale	A
80	69	m	Gh. lacrimale	marginale	R,D
81	84	f	Orbita	marginale	R,A
82	60	f	Orbita	marginale	A
83	42	m	Orbita	marginale	A

Tabella 1: Popolazione studio (NA: not available R: recidiva, A: alive, AWD: alive with disease, D: death)

## Tabella 2

Caso N.	c-Myc	p-NF-kBp65	A20 (IHC)	FISH Cr6
1	-	+	0	20% D
2	X	x	0	50% D
3	-	+	0	20% D1
4	-	+	x	10%D
5	-	-	0	30%D
6	-	-	0	20%D
7	-	x	0	20% Gain
8	-	-	0	10%D
9	X	x	x	10%D
10	-	x	0	20% D
11	-	+	0	30%D
12	-	+	x	X
13	-	+	0	Normale
14	-	-	0	10%D1
15	-	-	0	X
16	-	-	0	Normale
17	X	+	x	35%D1
18	-	-	0	10%D1
19	-	+	0	20%D
20	-	+	x	10%D
21	X	x	0	10%D
22	-	x	0	10%D
23	-	-	1	Normale
24	-	-	0	Normale
25	X	X	0	Normale
26	-	-	0	Normale
27	-	-	0	Normale
28	-	X	x	50%D
29	-	+	0	X
30	-	-	0	20%D1
31	-	-	0	Normale
32	-	X	0	20% Gain
33	-	-	x	30%D
34	-	-	x	15%D1
35	-	-	0	Normale
36	-	X	x	X
37	-	-	x	30%Gain
38	-	-	0	Normale
39	-	-	x	15%D1
40	-	X	0	30%D1
41	-	-	0	Normale
42	X	X	x	X
43	-	+	1	Normale
44	-	+	0	Normale
45	-	+	x	Normale
46	-	-	0	Gain
47	-	-	0	Normale
48	-	-	x	Gain
49	-	X	1	X
50	-	+	1	Gain
51	-	+	0	Normale
52	-	+	0	X
53	-	-	1	X
54	-	+	0	Gain
55	X	+	1	Gain
56	-	+	x	40%D1
57	-	-	1	Normale
58	-	-	1	Normale
59	-	+	0	Normale
60	-	+	1	Normale
61	-	+	0	
62	-	+	1	Gain

63	-	+	x	Gain
64	X	X	x	Normale
65	-	-	1	Normale
66	-	+	1	Normale
67	-	+	0	Normale
68	-	+	0	Normale
69	X	+	0	Normale
70	X	+	1	Normale
71	-	+	0	Normale
72	-	+	0	Normale
73	-	+	0	Normale
74	-	+	0	Normale
75	-	+	0	Normale
76	-	+	0	20% D
77	-	x	0	Normale
78	X	+	1	20% D1
79	-	+	0	Normale
80	X	X	x	X
81	-	+	0	Normale
82	-	+	0	Normale
83	-	+	1	Normale

**Tabella 2: Risultati valutazione immunohistochemica e FISH(A20, 0:neg, 1: pos; FISH D1:delezione tipica, D:delezione atipica).**

### Tabella 3

phospho-p65 NFkB	A20 IHC		P Value	R Pearson
	Bassa	Alta		
<20%	16 (72,7%)	6 (27,3%)	0,481	0,095
≥20%	21 (63,6%)	12 (36,4%)		

**Tabella 3 Valutazione associazione espressione A20-pNF-kBp65**

### Tabella 4

IHC A20	FISH		P value	R pearson
	Deleto	Normale o Gain		
Basso	16 (37,2%)	27 (62,8%)	0,020	0,304
Alto	1 (6,3%)	15 (93,7%)		

**Tabella 4 Valutazione associazione dati FISH ed espressione proteica A20**

**Tabella 5**

Age	FISH		P value	A20 IHC		P Value
	Deleto	Normale o Gain		Bassa	Alta	
<50	3	11	0,218	11 (73,3%)	4 (26,7%)	0,803
≥50	23 (39%)	36 (61%)		35 (70%)	15 (30%)	
Sesso						
Maschio	14	18	0,200	18 (58%)	13 (42%)	0,032
Femmina	12 (29,3%)	29 (70,7%)		28 (82,4%)	6 (17,6%)	
Istotipo						
Marginale	18	31	0,773	30 (68,2%)	14 (31,8%)	0,750
Follicolare	1 (36,7%)	2 (63,3%)		2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Mantellare	1	2		2 (100%)	0	
DBLC	1 (33,3%)	1 (66,7%)		3 (60%)	2 (40%)	
Altri	1 (50%)	1 (50%)		9 (81,8%)	2 (18,2%)	
	1 (14,3%)	6 (85,7%)				
	5 (41,7%)	7 (58,3%)				
Sede						
Orbita	20	39	0,350	36 (65,5)	19 (34,5%)	0,087
Gh	3 (33,9%)	7 (66,1%)		9 (100%)	0	
Lacrimale	1 (30%)	0 (70%)		X	X	
Congiuntiva	2 (100%)	1		1 (100%)	0	
Doppia	2 (66,7%)	1 (33,3%)				
Ki67						
<20%	11	19	0,990	19 (70,4%)	8 (29,6%)	0,371
≥20%	7 (36,7%)	12 (63,3%)		14 (82,4%)	3 (17,6%)	
	7 (36,8%)	12 (63,2%)				

**Tabella 5 Correlazione dati clinici-valori FISH-espressione A20**

## Figure

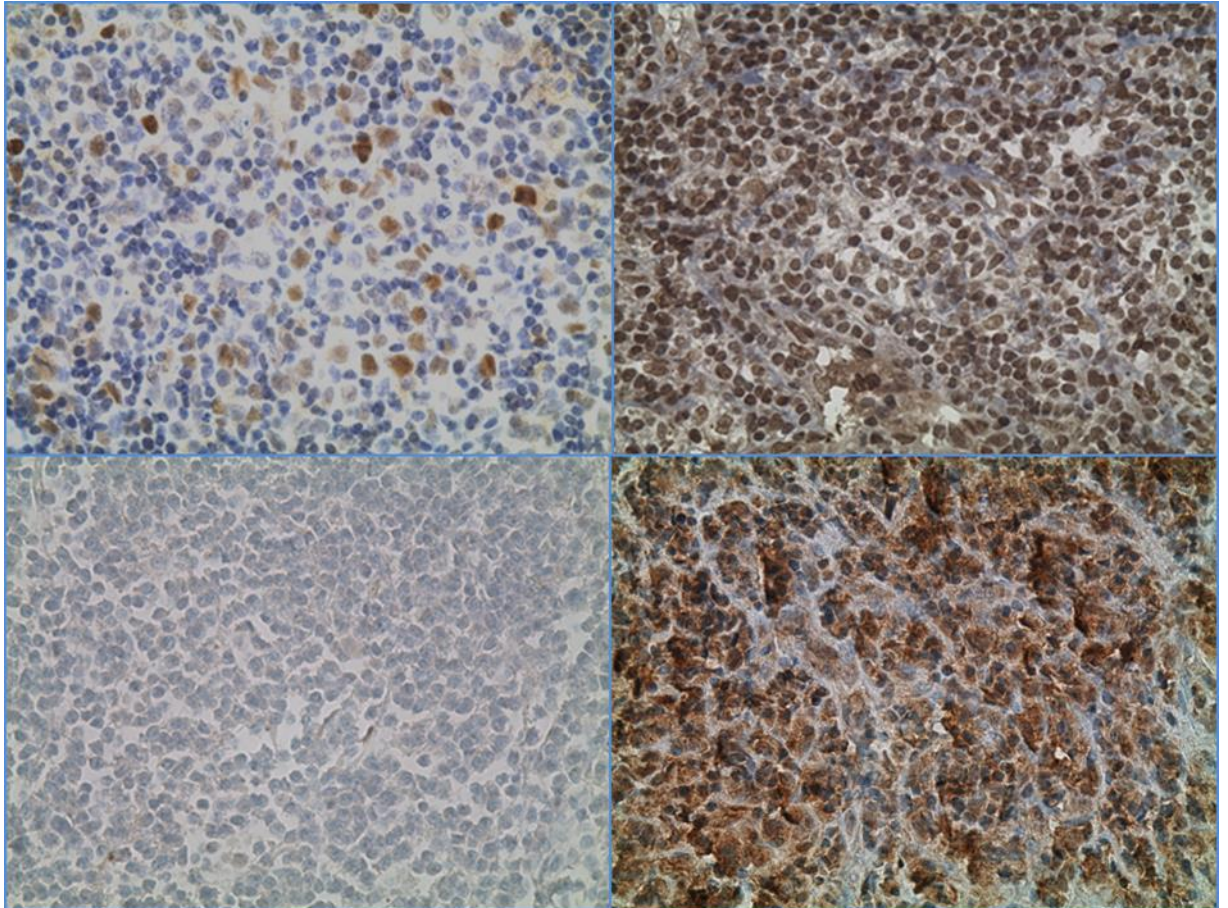


Figura 8 Valutazione immunoistochimica di c-MYC, pNF-kBp65, A20 (negativo), A20 (positivo)

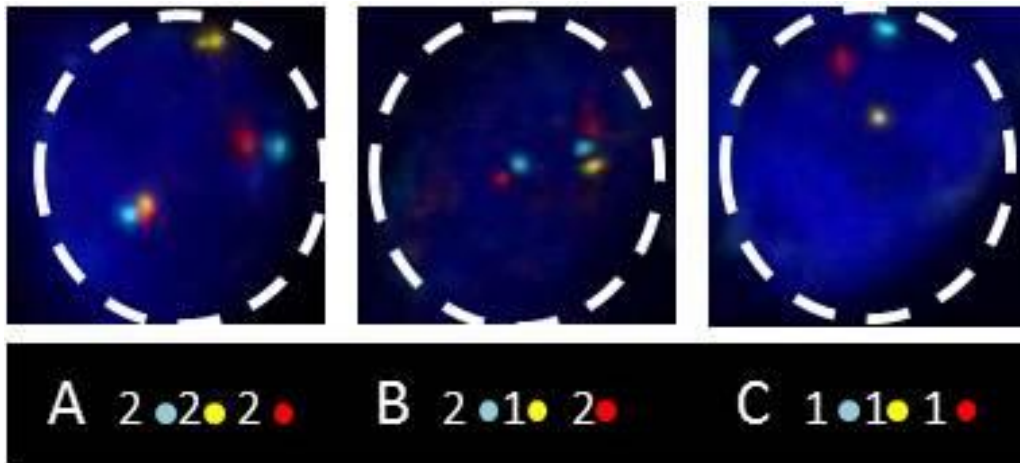


Figura 9A)disomico: 2 segnali SpectrumAqua CEP6, 2SpectrumGold 6q23, 2SpectrumRed 6p25.B )delezione 6q23: 2 segnali SpectrumAqua CEP6, 1SpectrumGold 6q23, 2SpectrumRed 6p25.C)monosomia cr 6:1 segnale SpectrumAqua CEP6,1SpectrumGold 6q23,1SpectrumRed 6p25

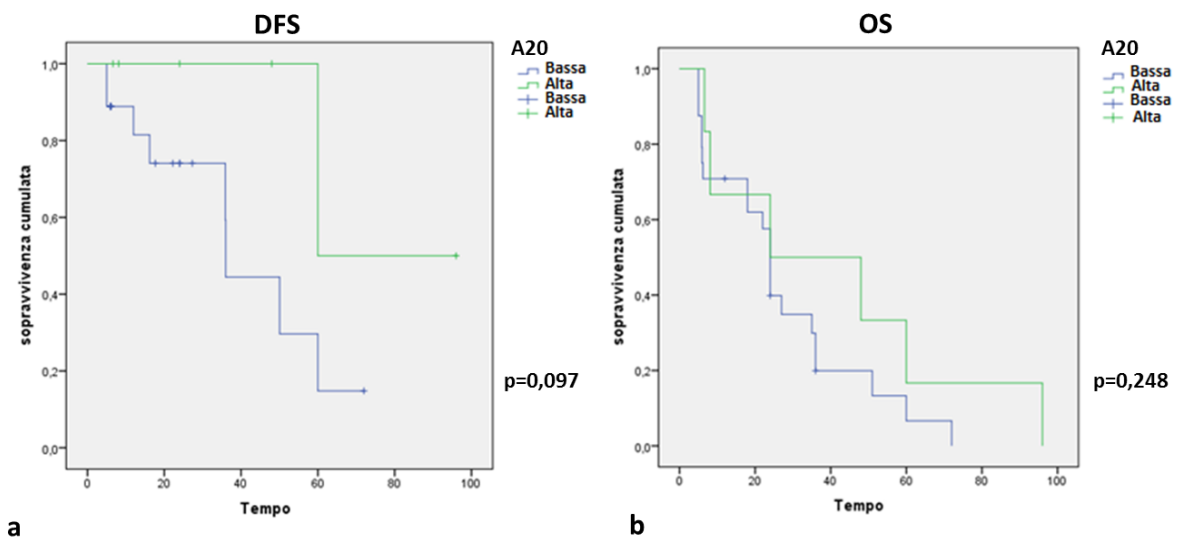


Figura 10 Sopravvivenza libera da malattia e OS,in relazione all'espressione di A20.

## BIBLIOGRAFIA

1. Expert Rev Ophthalmol. 2011 Apr;6(2):181-193. Ocular adnexal non-Hodgkin's lymphoma: a review of epidemiology and risk factors. Moslehi R, Schymura MJ, Nayak S, Coles FB.
2. J Natl Cancer Inst. 2006 Jul 5;98(13):936-9. Rapidly increasing incidence of ocular non-hodgkin lymphoma. Moslehi R, Devesa SS, Schairer C, Fraumeni JF Jr.
3. Am J Surg Pathol. 2007 Feb;31(2):170-84. Lymphoma of the ocular adnexa: A study of 353 cases. Ferry JAF, Fung CY, Zukerberg L, Lucarelli MJ, Hasserjian RP, Preffer FI, Harris NL.
4. AMA Arch Ophthalmol. 1952 Sep;48(3):328-37. Ocular involvement in lymphomatous disease. Feinstein AR, Krause AC.
5. Blood. 2009 Jul 16;114(3):501-10. Extranodal marginal zone lymphoma of the ocular adnexa. Stefanovic A, Lossos IS.
6. Oncologist. 2013;18(7):876-84. A reappraisal of the diagnostic and therapeutic management of uncommon histologies of primary ocular adnexal lymphoma. Ponzoni M, Govi S, Licata G, Mappa S, Giordano Resti A, Politi LS, Spagnuolo L, Di Cairano E, Doglioni C, Ferreri AJ.
7. Ann Oncol. 2008 May;19(5):835-46. Ocular adnexal MALT lymphoma: an intriguing model for antigen-driven lymphomagenesis and microbial-targeted therapy. Ferreri AJ, Dolcetti R, Du MQ, Doglioni C, Resti AG, Politi LS, De Conciliis C, Radford J, Bertoni F, Zucca E, Cavalli F, Ponzoni M.
8. Crit Rev Oncol Hematol. 2016 Apr;100:37-45. Review article: Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma of ocular adnexa. Biology and treatment. Annibali O, Sabatino F, Mantelli F, Olimpieri OM, Bonini S, Avvisati G.
9. Ophthalmology. 1998 Aug;105(8):1430-41. Lymphoproliferative lesions of the ocular adnexa. Analysis of 112 cases. Coupland SE, Krause L, Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Foss HD, Hummel M, Bornfeld N, Lee WR, Stein H.
10. WHO Classification of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4<sup>th</sup> ed IARC/WHO. Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). Isaacson P.G., Chott A., Nakamura S., et al.
11. Curr Opin Ophthalmol. 2006 Dec;17(6):523-31. Lymphomas involving the eye and the ocular adnexa. Coupland SE, Damato B.
12. Br J Ophthalmol. 2009 Aug;93(8):1047-51. Mantle cell lymphoma in the orbital and adnexal region. Rasmussen P, Sjö LD, Prause JU, Ralfkiaer E, Heegaard S.
13. Orbit. 2011 Mar;30(2):120-1. Rapidly fatal nasal natural killer/T-cell lymphoma: orbital and ocular adnexal presentations. Yousuf SJ, Kumar N, Kidwell ED Jr, Copeland RA Jr.

14. Clin Experiment Ophthalmol. 2001 Dec;29(6):387-93. Ocular adnexal lymphoproliferative disease: a series of 73 cases. McKelvie PA, McNab A, Francis IC, Fox R, O'Day J
15. Infect Agent Cancer. 2012 Apr 2;7:8. Chlamydia psittaci in ocular adnexa MALT lymphoma: a possible role in lymphomagenesis and a different geographical distribution. Collina F, De Chiara A, De Renzo A, De Rosa G, Botti G, Franco R.
16. J Natl Cancer Inst. 2004 Apr 21;96(8):586-94. Evidence for an association between Chlamydia psittaci and ocular adnexal lymphomas. Ferreri AJ, Guidoboni M, Ponzoni M, De Conciliis C, Dell'Oro S, Fleischhauer K, Caggiari L, Lettini AA, Dal Cin E, Ieri R, Freschi M, Villa E, Boiocchi M, Dolcetti R.
17. Ann Oncol. 2006 May;17(5):769-72. Clinical implications of hepatitis C virus infection in MALT-type lymphoma of the ocular adnexa. Ferreri AJ, Viale E, Guidoboni M, Resti AG, De Conciliis C, Politi L, Lettini AA, Sacchetti F, Dolcetti R, Doglioni C, Ponzoni M.
18. Ophthalmology. 2006 Jan;113(1):140-7. Epub 2005 Dec 19. Natural killer/T-cell lymphoma with ocular and adnexal involvement. Woog JJ, Kim YD, Yeatts RP, Kim S, Esmali B, Kikkawa D, Lee HB, Korn BS, Punja K, Habermann TM, Colgan JP, Salomao D, Cameron JD.
19. Nat Rev Cancer. 2004 Aug;4(8):644-53. MALT lymphoma: from morphology to molecules. Isaacson PG, Du MQ.
20. Blood. 2003 Mar 15;101(6):2335-9. T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J, Cerroni L, Stolte M, Ott G, Raderer M, Chott A
21. Mod Pathol. 2006 Aug;19(8):1055-67. Nuclear bcl10 expression characterizes a group of ocular adnexa MALT lymphomas with shorter failure-free survival. Franco R, Camacho FI, Caleo A, Staibano S, Bifano D, De Renzo A, Tranfa F, De Chiara A, Botti G, Merola R, Diez A, Bonavolontà G, De Rosa G, Piris MA.
22. Histol Histopathol. 2014 Jan;29(1):77-87. BCL10 expression and localization in ocular adnexa MALT lymphomas: a comparative cytogenetic and immunohistochemical study. Cerrone M, Collina F, De Chiara A, Corazzelli G, Curcio MP, De Renzo A, Russo F, Cantile M, Staibano S, Strianese D, Tranfa F, Botti G, De Rosa G, Franco R.
23. Hum Pathol. 2003 Nov;34(11):1212-5. T(14;18)(q32;q21) involving MALT1 and IGH genes in an extranodal diffuse large B-cell lymphoma. Cook JR, Sherer M, Craig FE, Shekhter-Levin S, Swerdlow SH.
24. Leukemia. 2005 Aug;19(8):1299-305. FOXP1, a gene highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphoma, is recurrently targeted by genomic aberrations. Wlodarska I, Veyt E, De Paepe P, Vandenberghe P, Nooijen P, Theate I, Michaux L, Sagaert X, Marynen P, Hagemeijer A, De Wolf-Peeters C. Genes



25. *Blood*. 2014 Nov 27;124(23):3431-40. FOXP1 directly represses transcription of proapoptotic genes and cooperates with NF- $\kappa$ B to promote survival of human B cells. van Keimpema M, Grüneberg LJ, Mokry M, et al.
26. *Gastroenterol Res Pract*. 2015;2015:102656. Molecular Pathogenesis of MALT Lymphoma. Troppan K, Wenzl K, Neumeister P, Deutsch A
27. *Semin Cancer Biol*. 2014 Feb;24:33-42. Chronic inflammation and extra-nodal marginal-zone lymphomas of MALT-type. Thieblemont C, Bertoni F, Copie-Bergman C, Ferreri AJ, Ponzoni M.
28. *BMC Cancer*. 2006 Oct 20;6:249. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of primary ocular adnexal MALT lymphoma. Tanimoto K, Sekiguchi N, Yokota Y, Kaneko A, Watanabe T, Maeshima AM, Matsuno Y, Harada M, Tobinai K, Kobayashi Y.
29. *Leukemia*. 2004 Oct;18(10):1722-6. Variable frequencies of MALT lymphoma-associated genetic aberrations in MALT lymphomas of different sites. Streubel B, et al.
30. *Chromosomes Cancer*. 2008 Jan;47(1):1-7. TNFAIP3 is the target gene of chromosome band 6q23.3-q24.1 loss in ocular adnexal marginal zone B cell lymphoma. Honma K, Tsuzuki S, Nakagawa M, Karnan S, Aizawa Y, Kim WS, Kim YD, Ko YH, Seto M.
31. *Blood*. 2009 May 14;113(20):4918-21. The NF- $\kappa$ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. Novak U, Rinaldi A, Kwee I, Nandula SV, Rancoita PM, Compagno M, Cerri M, Rossi D, Murty VV, Zucca E, Gaidano G, Dalla-Favera R, Pasqualucci L, Bhagat G, Bertoni F.
32. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):483-7. A20 is targeted by promoter methylation, deletion and inactivating mutation in MALT lymphoma. Chanudet E, Huang Y, Ichimura K, Dong G, Hamoudi RA, Radford J, Wotherspoon AC, Isaacson PG, Ferry J, Du MQ.
33. *J Clin Pathol*. 2016 Mar;69(3):266-70. Role of immunohistochemistry in the era of genetic testing in MYC-positive aggressive B-cell lymphomas: a study of 209 cases. Agarwal R, Lade S, Liew D, Rogers TM, Byrne D, Feleppa F, et al.
34. *Histopathology*. 2012 May;60(6B):E19-27. A novel A20 (TNFAIP3) antibody (Ber-A20) can be used to detect unmutated A20 by immunohistology. Hirsch B, Grünbaum M, Wagner F, Bi Y, Lucka L, Du MQ, Stein H, Dürkop H.
35. *Scand J Immunol*. 2016 Mar;83(3):181-7. Low Protein A20 in Minor Salivary Glands is Associated with Lymphoma in Primary Sjögren's Syndrome. Johnsen SJ, Gudlaugsson E, Skaland I, et al.
36. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2013 Mar-Apr;29(2):79-86. An analysis of 2,480 space-occupying lesions of the orbit from 1976 to 2011. Bonavolontà G, Strianese D, Grassi P, Comune C, Tranfa F, Uccello G, Iuliano A.
37. *Sci Rep*. 2013;3:2568. Involvement of A20 in the molecular switch that activates the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway. Yamaguchi N. et al.

38. J Pathol. 2009 Feb;217(3):420-30. A20 deletion is associated with copy number gain at the TNFA/B/C locus and occurs preferentially in translocation-negative MALT lymphoma of the ocular adnexa and salivary glands. Chanudet E, Ye H, Ferry J.
39. Cancer Genet Cytogenet. 2006 Mar;165(2):106-13. Chromosome band 6q deletion pattern in malignant lymphomas. Taborelli M, Tibiletti MG, Martin V, Pozzi B, Bertoni F, Capella C

