

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN TERAPIE AVANZATE BIOMEDICHE E
CHIRURGICHE**

DIRETTORE: Prof. Fabrizio Pane

XXXV CICLO

**UTILIZZO DELLA CONTRAST-ENHANCED ULTRASOUND (CEUS)
CON ESAFLUORURO DI ZOLFO NELL'IDENTIFICAZIONE
DELL'INVASIONE SPLENICA DA LINFOMA. STUDIO
MONOCENTRICO DI 260 NODULI**

**Docente Tutor
Ch.mo Prof. Marco Picardi**

**Dottorando
Dott. Fabio Trastulli**

Sommario

Capitolo 1: Introduzione	4
Capitolo 2: Materiali e Metodi	7
2.1 Disegno dello studio	7
2.2 Pazienti e metodi	7
2.2.1 Partecipanti.....	7
2.2.2 Metodi	8
2.2.3 Pattern CEUS	9
2.2.4 Definizione dei criteri di positività	9
2.2.5 Angiogenesi dei noduli splenici	10
2.3 Analisi statistica	10
Capitolo 3 Risultati	11
3.1 Partecipanti	11
3.1.1 Interessamento splenico in accordo con il reference standard	13
3.1.2 Interessamento splenico in accordo con CEUS	13
3.2 Accuratezza diagnostica	14
3.3 Distribuzione del pattern perfusionale nelle tre categorie di linfoma	15
3.4 Caratteristiche della neoangiogenesi dei noduli splenici	22
Capitolo 4 Discussione	23
Capitolo 5 Conclusioni	25
Capitolo 6. Bibliografia	26

Capitolo 1: Introduzione

La localizzazione splenica di malattie linfoproliferative avviene in un elevato numero di pazienti ed è infatti riportata nel 40% dei casi di Linfoma non Hodgkin e Linfoma di Hodgkin. Riscontri autoptici mostrano come in realtà questo dato sia nettamente superiore con riscontro di localizzazioni di malattia a livello splenico in oltre il 70% dei pazienti con malattia linfoproliferativa¹.

Sebbene l'esame istologico rimanga il gold standard per la diagnosi di infiltrazione, nei linfomi non è sempre possibile eseguire accertamento biotico su tutti gli organi interessati ed in particolare la milza rappresenta una sede di difficile esecuzione². Per tale motivo, numerosi studi clinici hanno esplorato la possibilità di evidenziare un interessamento splenico attraverso l'utilizzo di esami diagnostici convenzionali. Analizzando le diverse casistiche si è visto come la 18 FDG PET mostri una sensibilità dell'85% (range 50-100%) nel diagnosticare interessamento splenico, risultato di conseguenza la metodica più sensibile, mentre la risonanza magnetica con mezzo di contrasto mostri una sensibilità del 85% (range 62-96%) e la TC con mezzo di contrasto del 58% (range 33-94%)^{1,3-7}.

L'ecografia con mezzo di contrasto, invece, è una metodica non invasiva e largamente riproducibile anche per l'assenza di radiazioni ionizzanti e la facilità di esecuzione, ma la sua sensibilità ed accuratezza richiede validazione in studi comprendenti un'ampia casistica di noduli sospetti e pazienti⁴.

In ambito oncologico l'ecografia è di norma utilizzata per valutare la presenza di interessamento d'organo sia a diagnosi che in follow up per la valutazione di eventuali recidive, l'American College of Radiology ha recentemente pubblicato un sistema basato sull'utilizzo dell'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) per identificare il rischio di presenza di noduli da carcinoma epatocellulare nei pazienti cirrotici sottoposti a ecografi (Liver Imaging Reporting and Data System – LI-RADS)⁸.

La classificazione LI-RADS include 5 differenti categorie di lesioni osservabili alla CEUS da LR1 a LR5 di cui quest'ultima mostra tipici pattern diagnostici di carcinoma epatocellulare corrispondente a un iper enhancement in fase arteriosa seguito da un lento e modesto wash out. Un'altra categoria di lesione è rappresentata da LR-M, caratterizzata dalla possibile presenza di lesione maligna non correlabile a HCC con caratteristiche ecografiche di rim-enhancement in fase arteriosa oppure con un rapido e marcato wash out in fase venosa⁹(Figura 1).

Le caratteristiche dell'enhancement e del wash out, unite alla dimensione della massa, permettono così di identificare in pazienti ad alto rischio la possibile presenza di lesione maligna riducendo nettamente sia l'esposizione a radiazioni ionizzanti quali la TC e facilitando quindi il follow up evitando quindi di esporre il paziente a biopsia epatica quando non necessario.

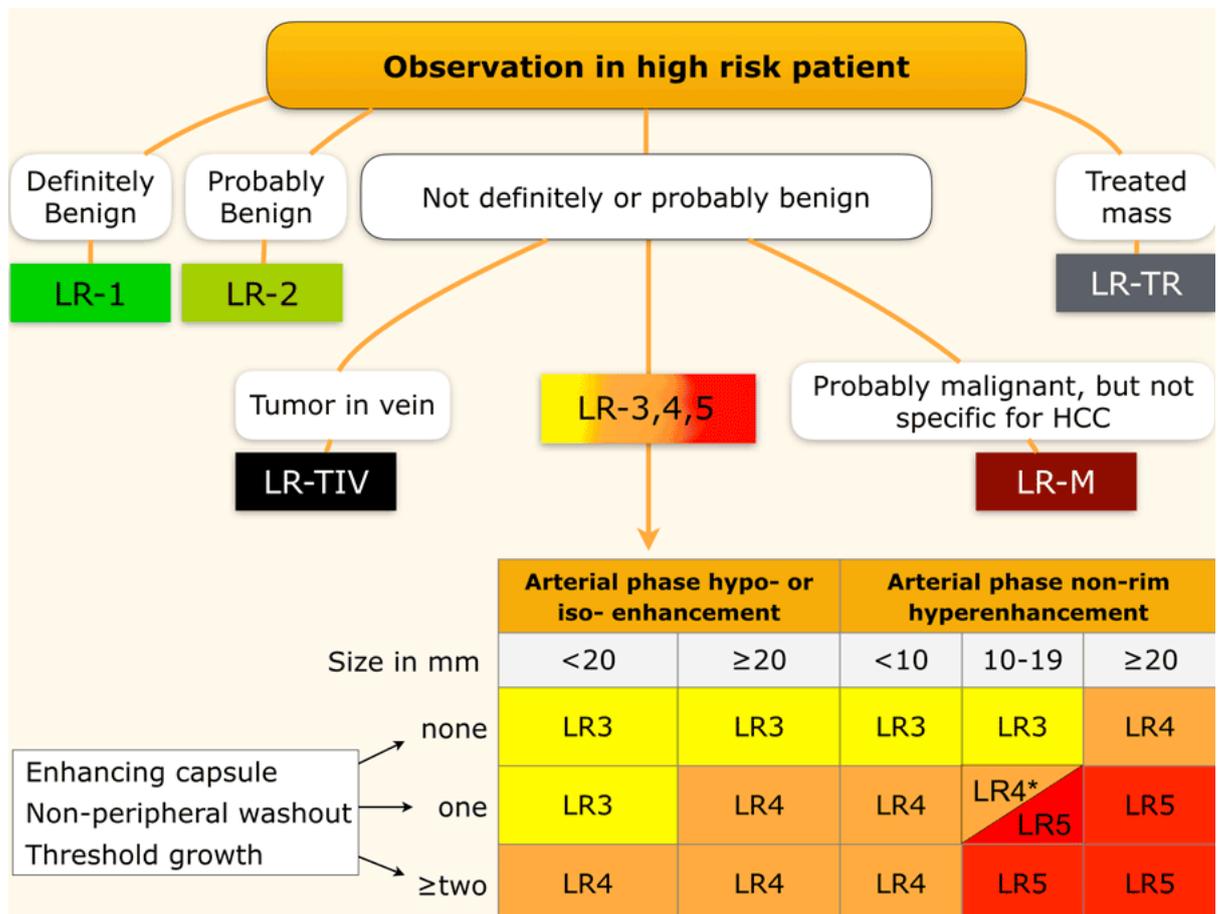


Figura 1: algoritmo diagnostico delle lesioni epatiche tramite LI-RADS in soggetti a rischio per epatocarcinoma

I numerosi benefici della CEUS a fronte dei bassi rischi, hanno quindi fatto emergere tale metodica anche nella diagnostica di lesioni non epatiche e specialmente nella diagnostica di localizzazioni spleniche da malattia linfoproliferativa¹⁰. Sebbene vi sia un grande potenziale nell'utilizzo di questa metodica, questa ad oggi rappresenta solo un accompagnamento a quelle che sono le raccomandazioni nella stadiazione a diagnosi e nel follow up dei linfomi^{11,12}. Inoltre, tutti gli studi effettuati finora avevano l'obiettivo solo di localizzare un eventuale lesione, ma nessuno di essi era stato condotto con l'obiettivo di mostrare le caratteristiche tipiche dei diversi istotipi.

Sulla base di caratteristiche anatomopatologiche delle lesioni spleniche da malattia linfoproliferativa si è deciso quindi di valutare l'accuratezza dell'ecografia con mezzo di

contrasto (CEUS) nella diagnostica di lesioni nodulare spleniche sospette per malattia linfoproliferativa. Come obiettivo secondario inoltre abbiamo esplorato i differenti pattern perfusionali delle tre principali categorie di linfoma: Linfomi non Hodgkin aggressivi (a-LNH), Linfoma di Hodgkin classico (c-LH) e Linfomi non Hodgkin indolenti (i-LNH).

La proliferazione vascolare nelle malattie linfoproliferative è, infatti, direttamente proporzionale all'indice proliferativo delle stesse. Come evidenziato da Tzankov et al., nelle biopsie linfonodali positive per linfoma il vascular endothelial growth factor (VEGF) è infatti iperespresso nei linfomi ad alto indice di crescita (elevato Ki67) e nelle patologie p53 mutate. Anche l'espressione di flk-1 si correla ad alto indice proliferativo¹³.

Si è deciso quindi anche di valutare, in un ristretto campioni di lesioni da linfoma sottoposte a biopsia tramite splenectomia o core needle biopsy, la microdensità vascolare sia tramite l'aspetto morfologico che con immunohistochimica. La valutazione anatomopatologica è quindi stata correlata al dato CEUS al fine di spiegare il comportamento contrastografico delle lesioni spleniche.

In ultimo è stato indagato come la CEUS possa impattare la stadiazione dei pazienti con linfoma a rischio di interessamento splenico.

Capitolo 2: Materiali e Metodi

2.1 Disegno dello studio

Nel nostro istituto la CEUS è un esame di routine effettuato in tutti i pazienti con lesioni spleniche visibili al baseline tramite ecografia e/o altra metodica di imaging ed a rischio di localizzazione da linfoma^{4,14}. Per tale motivo è stato possibile raccogliere retrospettivamente tutti i pazienti con clinica sospetta di infiltrazione splenica da linfoma su uno o più noduli e che avevano effettuato diagnosi istologica di linfoma tramite biopsia escissionale o core-needle biopsy¹⁵⁻¹⁷.

Tutte le immagini CEUS raccolte durante l'esecuzione dell'esame sono state quindi registrate nel database dell'unità di Ematologia della Federico II e quindi analizzate per determinare il preciso timing dell'enhancement in fase arteriosa, il timing di inizio del wash-out e l'intensità dello stesso durante la fase venosa.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'università Federico II ed il consenso informato è stato acquisito prima dell'esecuzione dell'esame CEUS.

2.2 Pazienti e metodi

2.2.1 Partecipanti

I criteri di inclusione nello studio sono stati:

- Diagnosi istologica di linfoma in accordo con i criteri WHO 2016 e trattati secondo le linee guida National Comprehensive Cancer Network (NCCN)¹⁵⁻¹⁹
- Presenza di ecografia al baseline (B-mode) con scansioni spleniche mostranti la presenza di noduli ed in particolare lesioni ipoecogene >0,5cm sull'asse lungo successivamente indagate tramite CEUS
- Esecuzione di CEUS con possibilità di valutazione dei noduli attraverso la descrizione di:
 - a) Caratteristiche dell'enhancement in fase arteriosa
 - b) Tempo di insorgenza di enhancement in fase arteriosa
 - c) Tempo di insorgenza del wash-out
 - d) Caratteristiche del wash-out

La metodica CEUS è stata successivamente validata attraverso il gold standard (almeno un esame di imaging convenzionale come 18-FDG PET TC, TC con mezzo di contrasto iodato, RMN con mezzo di contrasto)^{5,6,20}.

La diagnosi definitiva dei noduli splenici relativa ai sotto istotipi di linfoma è stata effettuata attraverso:

- Esame istologico di linfonodi superficiali e profondi seguito da follow up clinico/laboratoristico/strumentale di durata uguale o superiore ai sei mesi dall'esame CEUS (monitoraggio post terapia)
- Splenectomia o biopsia splenica se possibile e clinicamente indicato²¹

La diagnosi dei noduli benigni è stata effettuata attraverso follow up clinico/laboratoristico/strumentale di durata uguale o superiore ai sei mesi dall'esame CEUS (monitoraggio post terapia) o splenectomia/biopsia splenica quando possibile o se clinicamente indicato

Gli esami sono stati eseguiti dal 01 Gennaio 2009 fino al 31 Gennaio 2019

2.2.2 Metodi

L'indagine ultrasonografica della milza è stata effettuata da ematologi con esperienza di oltre 10 anni nella diagnostica e nel work up delle malattie linfoproliferative e nella diagnosi delle stesse tramite ecografia e CEUS^{4,14}. Gli apparecchi utilizzati, in considerazione del lungo follow up, sono stati due (iU22 Philips Healthcare equipaggiato con tissue harmonic compound technology (SonoTC) e una 2-5 MHz sonda curvilineare; EPIQ-5 Philips Healthcare con SonoTC a 1-5 MHz sonda curvilineare).

Le scansioni sono state effettuate al baseline, osservando la presenza di uno o più noduli ipoecogeni con misurazione delle dimensioni sull'asse lungo dello stesso. Dopo compilazione del consenso informato è stata quindi effettuata una CEUS tramite somministrazione di agente di contrasto contenente sulfur-hexafluoride-filled phospholipid stabilized microbubbles (Sonovue, Bracco) alla dose di 2,4 ml rapidamente iniettato tramite un ago 20-G su vena periferica. L'analisi contrastografica è stata iniziata immediatamente dopo l'iniezione con esame di durata media fra 7-9 minuti dopo somministrazione di contrasto. Ogni esame ha valutato la fase arteriosa (inizio 10 sec dopo la somministrazione del contrasto) e la fase parenchimale (inizio 40 sec dopo iniezione di mezzo di contrasto, con osservazione delle microbolle a livello dei sinusoidi e fino alla scomparsa delle stesse)⁴.

2.2.3 Pattern CEUS

Durante l'esame CEUS sono stati descritti diversi pattern contrastografici. La descrizione degli stessi è stata poi analizzata in rapporto alle caratteristiche istotipiche delle lesioni al fine di valutare se vi fosse una correlazione tra il pattern contrastografico e la tipologia di lesione in esame. Di seguito sono descritti i pattern contrastografici osservati nei pazienti sottoposti a CEUS:

- Arterial phase isoenhancement: lesione globalmente isoecogena rispetto al parenchima circostante in fase arteriosa
- Arterial phase hypoenhancement: lesione globalmente ipoecogena rispetto al parenchima circostante in fase arteriosa
- Arterial phase hyperenhancement: lesione globalmente iperecogena rispetto al parenchima circostante in fase arteriosa
- Rim enhancement pattern: incremento del rinforzo contrastografico presente alla periferia del nodulo seguito da wash out lento
- Peripheral discontinuous globular pattern: incremento contrastografico alla periferia del nodulo con progressivo aumento del rinforzo in maniera centripeta parziale o totale
- Reverse rim: rinforzo contrastografico minore alla periferia del nodulo rispetto alla porzione centrale dello stesso

Per wash out invece è stato descritto il comportamento della lesione con tendenza a diventare ipoecogena rispetto al parenchima circostante nella fase portale-venosa. Quando si è vista evidenza del wash out, che rappresenta la fuoriuscita delle microbolle dal letto vascolare della lesione, esso è stato descritto come:

- Early: quando è apparso entro i 60 secondi dalla somministrazione del mezzo di contrasto
- Late: quando comparso dopo i 60 secondi dalla somministrazione del mezzo di contrasto
- Marked: se la lesione diventava scura rispetto al parenchima circostante, fuoriuscita del mezzo di contrasto dal letto vascolare della lesione entro i due minuti
- Mild: se non vi erano le caratteristiche descritte per il wash out marked⁴

2.2.4 Definizione dei criteri di positività

Sulla base delle caratteristiche dei pattern CEUS precedentemente descritti sono stati definiti i criteri di positività delle lesioni

Criteri diagnostici alla CEUS per LNH e LH: noduli di dimensioni \geq a 0.5 cm con iso-enhancement in fase arteriosa seguito da rapido e marcato wash out

Criteri diagnostici per lesioni benigne, noduli con dimensioni \geq 0.5 cm con:

- i. Ipo-enhancement in fase arteriosa senza lento wash out (lesioni granulomatose, infarto splenico)
- ii. Iso-enhancement in fase arteriosa con o senza lento wash out ed intensità mild (emangioma capillare)
- iii. Discontinuo pattern di enhancement periferico seguito da riempimento centripeto o wash out molto lento (emangioma cavernoso)
- iv. Rim enhancement in fase arteriosa seguito da wash out in fase venosa (ascesso)
- v. Reverse rim: metaplasia mieloide da stimolazione da G-CSF
- vi. Hyper-enhancement in fase arteriosa senza wash out (amartoma)^{10,22}

2.2.5 Angiogenesi dei noduli splenici

Come post hoc analisi è stata valutata la densità microvascolare sia tramite immunoistochimica che attraverso la valutazione morfometrica del vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) e del recettore per VEGF¹³. È stata inoltre valutata l'espressione della ciclossigenasi COX2.

Queste valutazioni sono state effettuate sui noduli contenenti inequivocabilmente infiltrazione da linfoproliferativa B sia morfologicamente tramite fissazione in H&E sia in immunoistochimica

2.3 Analisi statistica

Al termine dell'analisi statistica sono stati riportati i seguenti parametri: sensibilità (probabilità che la CEUS riporti un risultato positivo quando la malattia è presente – rate veri positivi); specificità (probabilità che la CEUS riporti un risultato negativo quando la malattia è assente – rate veri negativi); valore predittivo positivo (probabilità che la malattia è presente quando il test è positivo); valore predittivo negativo (probabilità che la malattia sia assente quando il test è negativo), accuratezza diagnostica (probabilità che il nodulo sia correttamente classificato = sensibilità x prevalenza + specificità x (1 – prevalenza))²³.

Le variabili continue sono state riportate tramite mediana e range. L'analisi descrittiva è stata effettuata riportando i rate sia in numeri assoluti che in percentuali. La comparazione tra gruppi è stata effettuata tramite test non parametrici (Mann-Whitney e Wilcoxon).

La variabile categoriale è stata considerata statisticamente significativa in caso di $p < 0.05$.

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software per analisi statistica SPSS.

Capitolo 3 Risultati

3.1 Partecipanti

Sono stati analizzati 264 noduli splenici da 78 pazienti. Un paziente con 4 noduli è stato escluso per un esame istologico non univoco a seguito di un prelievo con CNB, e quindi l'analisi finale è stata effettuata su 260 noduli di 77 differenti pazienti.

Il tempo mediano per esecuzione dell'esame è stato di 30 minuti (range 20 -45 minuti) sempre ben tollerato e senza l'evidenza di effetti collaterali dopo infusione del mezzo di contrasto.

Tutti gli esami erano valutabili al fine della classificazione finale. Nella figura si evidenziano le classificazioni dei noduli in base alle loro caratteristiche ultrasonografiche secondo i criteri STARD (figura 2.)

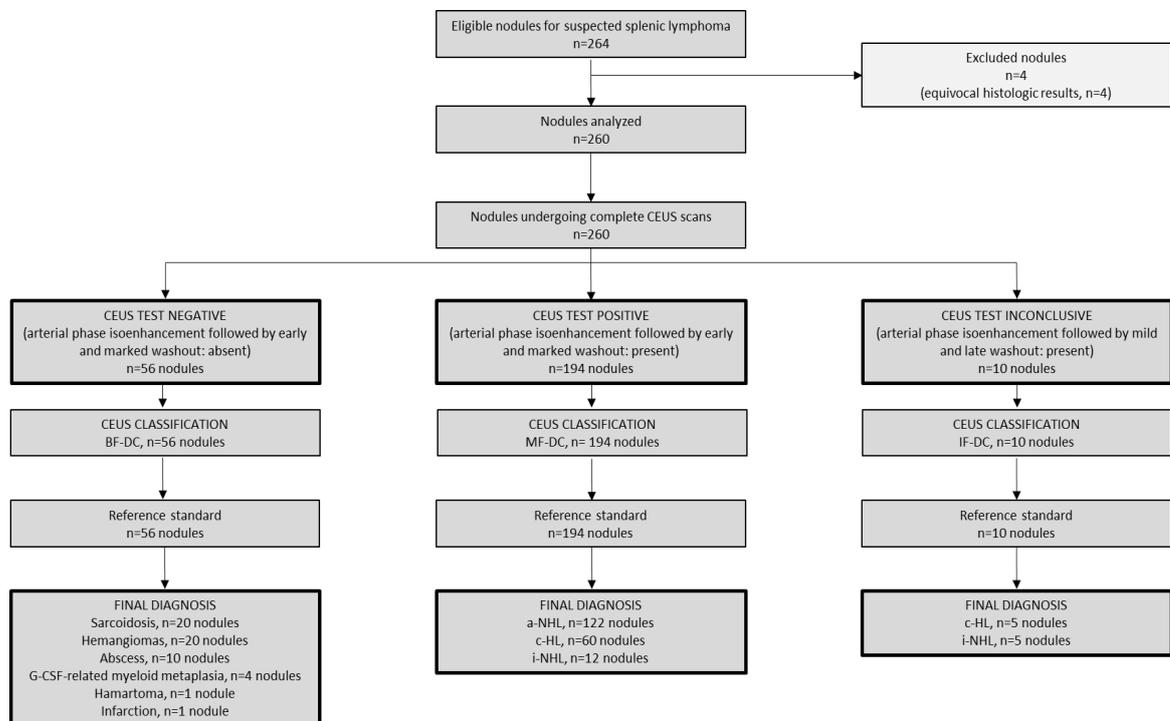


Figura 2. Diagramma CONSORT

La mediana di età dei pazienti è stata di 48 anni (range 22 – 75) con il 57% dei soggetti di sesso maschile. In 56 pazienti i 198 noduli (76%) sono stati trovati durante la fase di

stadiazione. La terapia prevista era ABVD (adriplastina, bleomicina, vimblastina, dacarbazina) in 30 pazienti; R-CHOP (rituximab ciclofosfamide doxorubicina vincristina prednisone) in 23 e R-Bendamustina (rituximab bendamustina) in 3 pazienti¹⁹. In 21 pazienti i 64 noduli (24%) sono stati rinvenuti durante il follow up per linfomi precedentemente trattati con R-CHOP in 14 casi, CHOP 4 casi, ABVD 3 casi.

La grandezza mediana dei noduli era di 1,5 cm (range 0,5 – 7 cm). Due o più noduli erano presenti in 47 pazienti (2-4 in 21; > 5 in 26 pazienti) mentre un singolo nodulo era presente in 30 pazienti.

Dopo la valutazione clinica e di imaging, 230 noduli erano accompagnati da linfadenomegalie mentre 30 noduli erano presenti a livello splenico senza evidenza di altre linfadenomegalie o interessamento d'organo (Tabella 1)

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti e dei noduli		
Variable	Patients (n= 77)	Nodules (n=260)
Patient's gender male	43 (57%)	
Patient's age; median, years (range)	48 (22-72)	
Timing of the discovery of nodules		
Staging for lymphoma	56 (72%)	
Follow-up for lymphoma	21 (28%)	
Nodule size; median, cm (range)		1,5 (0,6 – 7)
Aetiology of nodules		
Malignancy		204 (78%)
DLBCL		108 (53%)
TRBCL		10 (5%)
ATCL		4 (2%)
FL		17 (8%)
NS-HL		50 (25%)
MC-HL		11 (5%)

LR-HL	4 (2%)
Benignity	56 (22%)
Sarcoidosis	20 (36%)
Hemangiomas	20 (36%)
Abscess	10 (17%)
Myeloid metaplasia	4 (7%)
Hamartoma	1 (1%)
Splenic infarction	1 (1%)

3.1.1 Interessamento splenico in accordo con il reference standard

In accordo con il reference standard, 204 noduli (in 55 pazienti) erano classificabili come LNH “aggressivo” (108 linfoma diffuso a grandi cellule B, 10 linfoma diffuso a grandi cellule B ricco in linfociti T, 4 linfoma T anaplastico) 65 noduli erano classificabili come LH (50 sclerosi nodulare, 11 cellularità mista, 4 ricco in linfociti). Diciassette noduli erano classificabili come LNH “indolente” (linfoma follicolare grado 1-2). I noduli erano più grandi nei LNH aggressivi (1,5 cm mediana, range 0,6 – 7 cm) e più piccoli nei linfomi indolenti (0,6 cm mediana, range 0,5 – 0,8 cm). La grandezza mediana dei noduli da LH era di 1,5 cm con range 1-2 cm.

I 56 noduli rimanenti (22 pazienti) sono stati classificati come benigni in accordo con il reference standard: 20 granulomi da sarcoidosi, 20 emangiomi, 10 ascessi da infezione (8 da funghi e 2 da batteri) 4 da metaplasia mieloide post G-CSF, 1 amartoma e 1 infarto splenico.

3.1.2 Interessamento splenico in accordo con CEUS

Un totale di 194 noduli è risultato positivo alla CEUS per linfoma. Il pattern di enhancement caratteristico è stato iso (nella fase arteriosa) e ipo (in quella venosa) quest’ultima caratterizzata da un wash out rapido e marcato. Tali caratteristiche si sono osservate nel 100% delle lesioni.

In particolare, il wash out è comparso dopo una mediana di 43 secondi (range 20 - 60) ed il tempo mediano al termine dello stesso (marked wash out) è stato 73 secondi (range 55 –

120). Le caratteristiche dei pattern dei 56 noduli benigni sono state differenti a seconda della lesione e sono riassunte nella tabella 2.

Table 2. Pattern CEUS dei noduli benigni				
Eziologia	Median size cm (range)	Ultra sound pattern		Reference standard
		Arterial phase	Portal phase	
Sarcoidosi n=20	1,5 (0,7 – 2,2)	Multiple hypo-enhanced lesions	Multiple hypo-enhanced lesions	Biopsia linfonodale e/o follow up di imaging n=20
Emangioma n=20	1,5 (1,1 – 6)	Peripheral nodular enhancement	Partial/complete fill-in (iso-enhancement)	Follow up n=20
Ascesso n=10	1,1 (0,7 – 1,5)	Hyper-enhancement RIM with central hypo-enhancement	Hyper-enhancement RIM with central hypo-enhancement	Blood culture test n=10 <ul style="list-style-type: none"> • Bacteria n=2 • Fungus n=8
Metaplasia mieloide n=4	2,5 (2 – 3,2)	Hypo-enhancement RIM (reversed RIM) with central hyper-enhancement	Iso-enhancement	Follow up n=4
Hamartoma n=1	7	Hypo-enhancement	Hypo-enhancement	Follow up n=1
Infarto splenico n=1	6	Hypo-enhancement	Hypo-enhancement	Follow up n=1

Ulteriori 10 noduli sono stati classificati come inconclusivi alla CEUS. Le dimensioni mediane erano di 1 cm (range 0,8 – 1,5) ed il pattern di tutte le lesioni era caratterizzato da un iso enhancement in fase arteriosa seguito da un wash out lento e mild. Di questi noduli 5 sono stati classificati come HL (3 cellularità mista, 2 sclerosi nodulare) e 5 come LNH indolente (grado 1 – 2 linfoma follicolare)

3.2 Accuratezza diagnostica

La concordanza nella classificazione CEUS fra riscontro positivo e lesione maligna è stata elevata. La sensibilità è stata del 95% (95% intervallo di confidenza (IC) 91% - 98%), ovvero 194 noduli su 204 positivi per linfoma sono stati identificati alla CEUS, con un rate di falsi negativi del 5% (10 noduli inconclusivi). La specificità è stata del 100% (95% IC:

94% - 100%); il valore predittivo positivo (PPV) è stato del 100% (95% IC: 98.5 – 100%) ed il valore predittivo negativo del 85% (95% IC: 74% - 92%)

Anche la concordanza fra la presenza di noduli benigni e negatività alla CEUS è stata eccellente, con un 100% di accordo fra CEUS ed istologia.

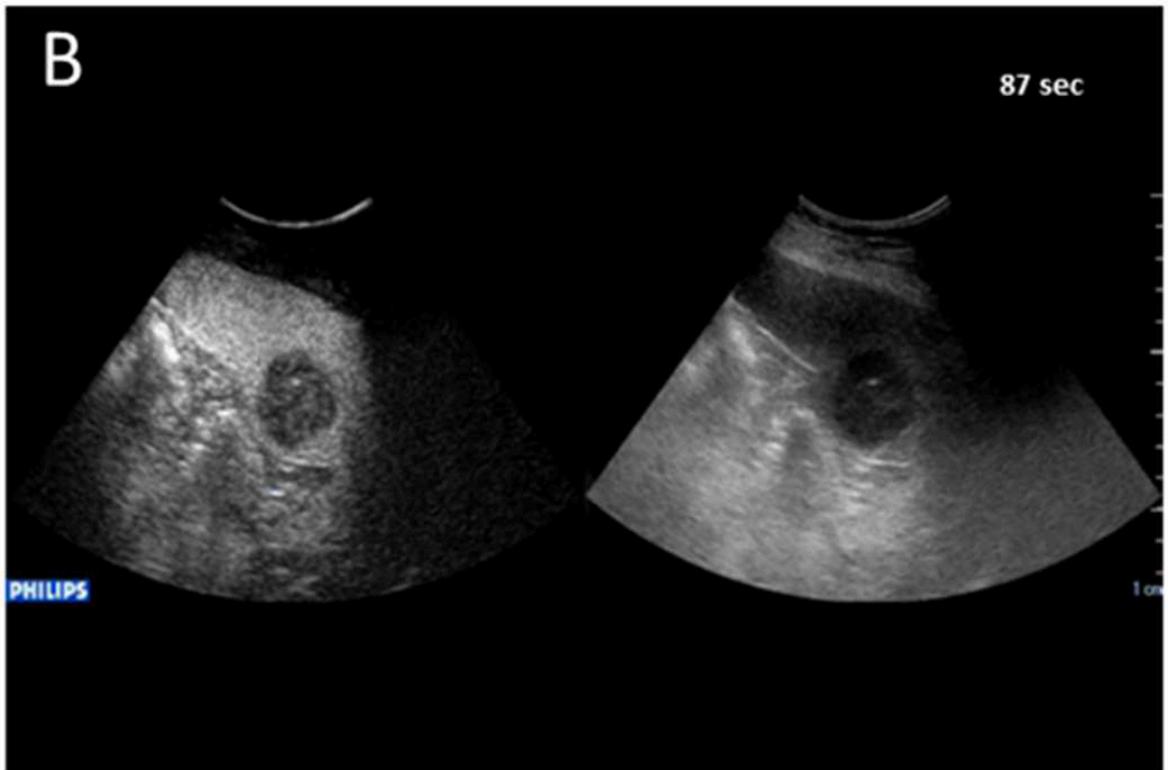
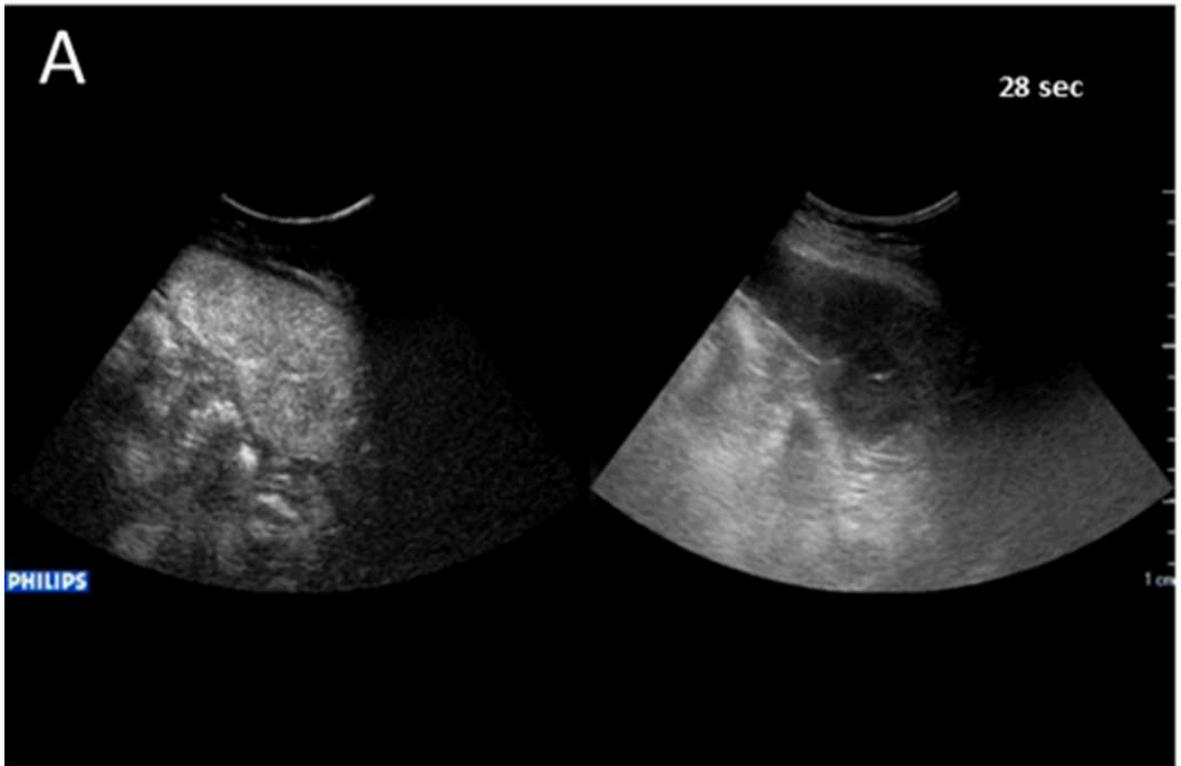
In conclusione, l'accuratezza è stata del 96% (95% IC: 93% - 98%) con la CEUS che è riuscita correttamente a classificare 250 noduli su 260 (Tabella 3)

Tabella 3. Accuratezza della CEUS per la diagnosi di interessamento splenico da linfoma nei 260 noduli analizzati nello studio.	
Accuracy measurement	Results
Reference standard*	100% (260/260 nodules)
Sensitivity	95% (95% CI, 91-98)
Specificity	100% (95% CI, 94-100)
Positive predictive value	100% (95% CI, 98-100)
Negative predictive value	85% (95% CI, 74-92)
False-negative finding	5% (10/260 nodules)
False-positive finding	-
Overall diagnostic accuracy	96% (95% CI, 93-98)

Note. – CEUS, contrast-enhanced ultrasonography; CI, confidence interval
 *La diagnosi definitiva di linfoma è stata effettuata sulla base dell'istologia su linfonodo patologico più follow up clinico, laboratoristico e di imaging in 174 noduli e splenectomia o core needle biopsy in 30 noduli. La diagnosi di eziologia benigna è stata effettuata con follow up clinico, laboratoristico o di imaging in 46 noduli e test microbiologici seguiti da specifica terapia in 10 noduli.

3.3 Distribuzione del pattern perfusionale nelle tre categorie di linfoma

Abbiamo suddiviso i pattern di wash out nelle tre categorie di linfoma, 122 noduli di LNH aggressivo, 60 di linfoma di Hodgkin e 12 di LNH indolente. I linfomi aggressivi hanno mostrato un iso enhancement in fase arteriosa seguito da una rapida insorgenza di wash out con un completamento dello stesso entro i 90 secondi dall'infusione del mezzo di contrasto (122/122, 100%). L'inizio del wash out è avvenuto con un tempo mediano di 42 secondi (range 20 – 55) seguito da un marked wash out mediano di 74 secondi (range 55 – 90) (Figura 3).



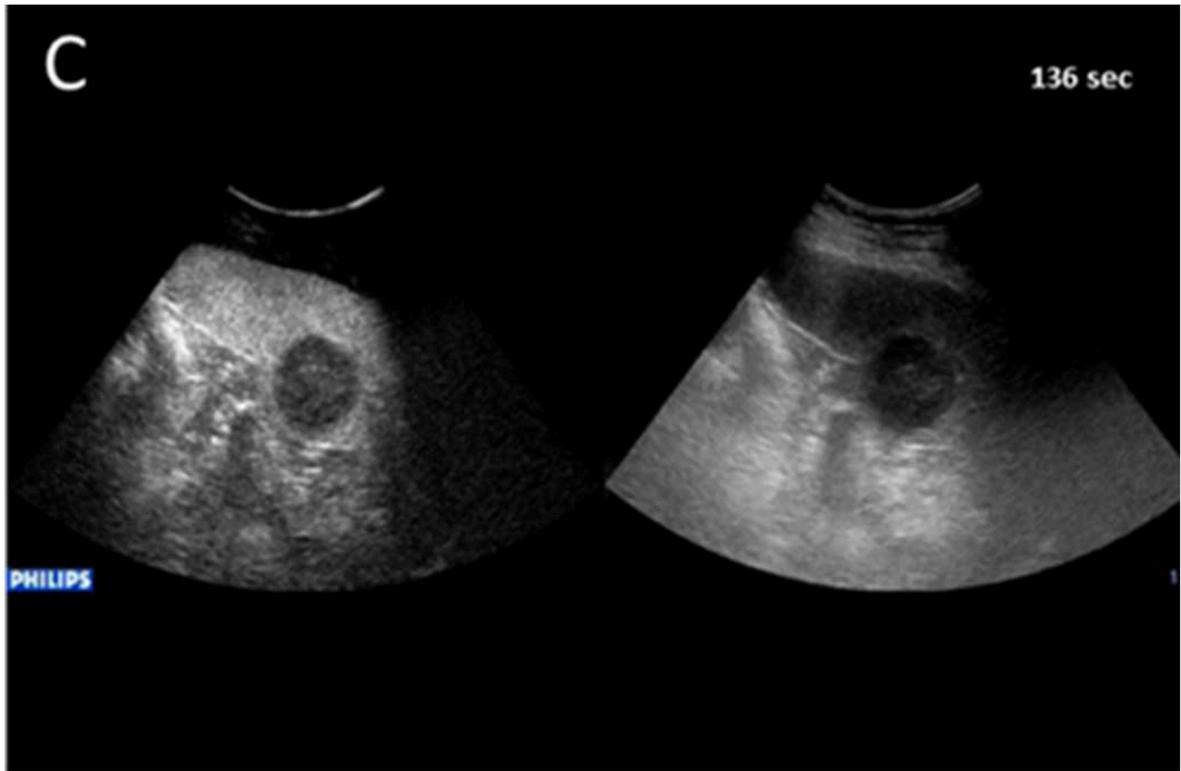
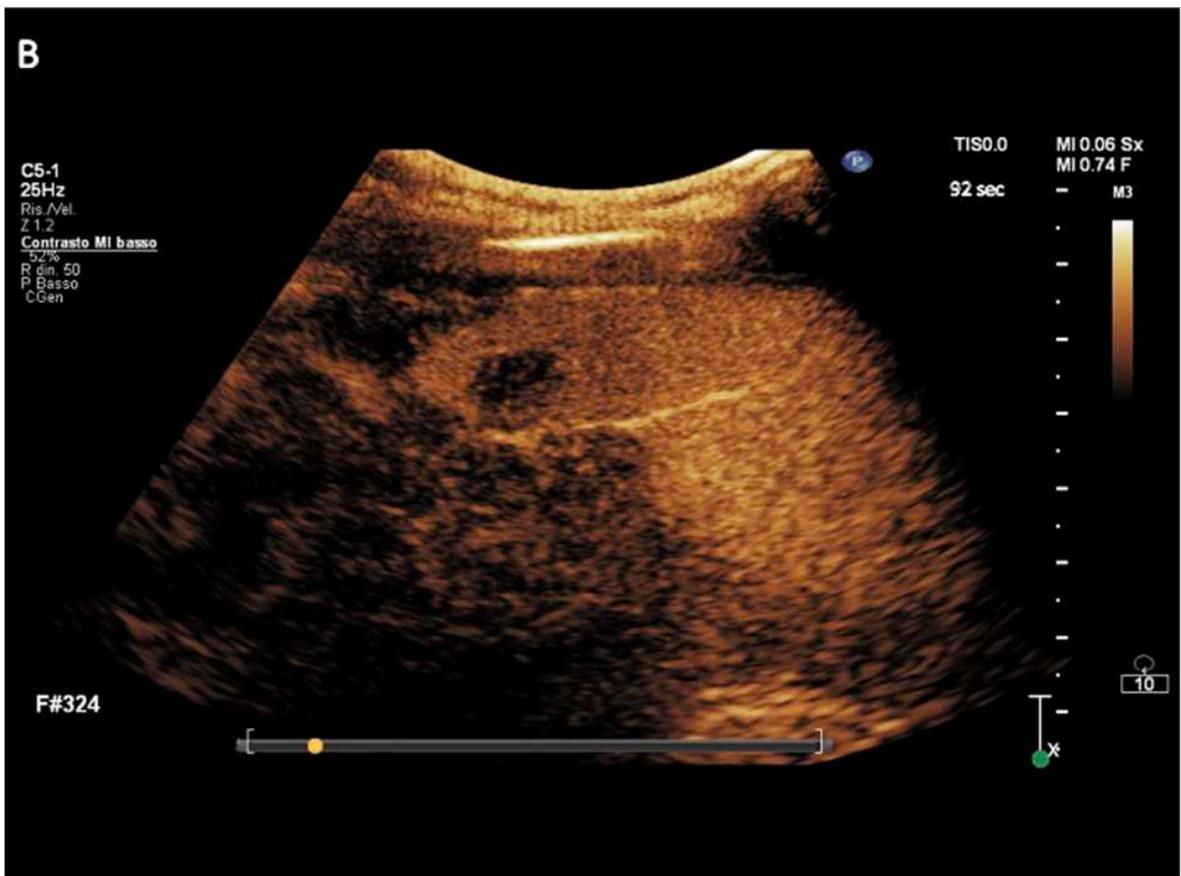
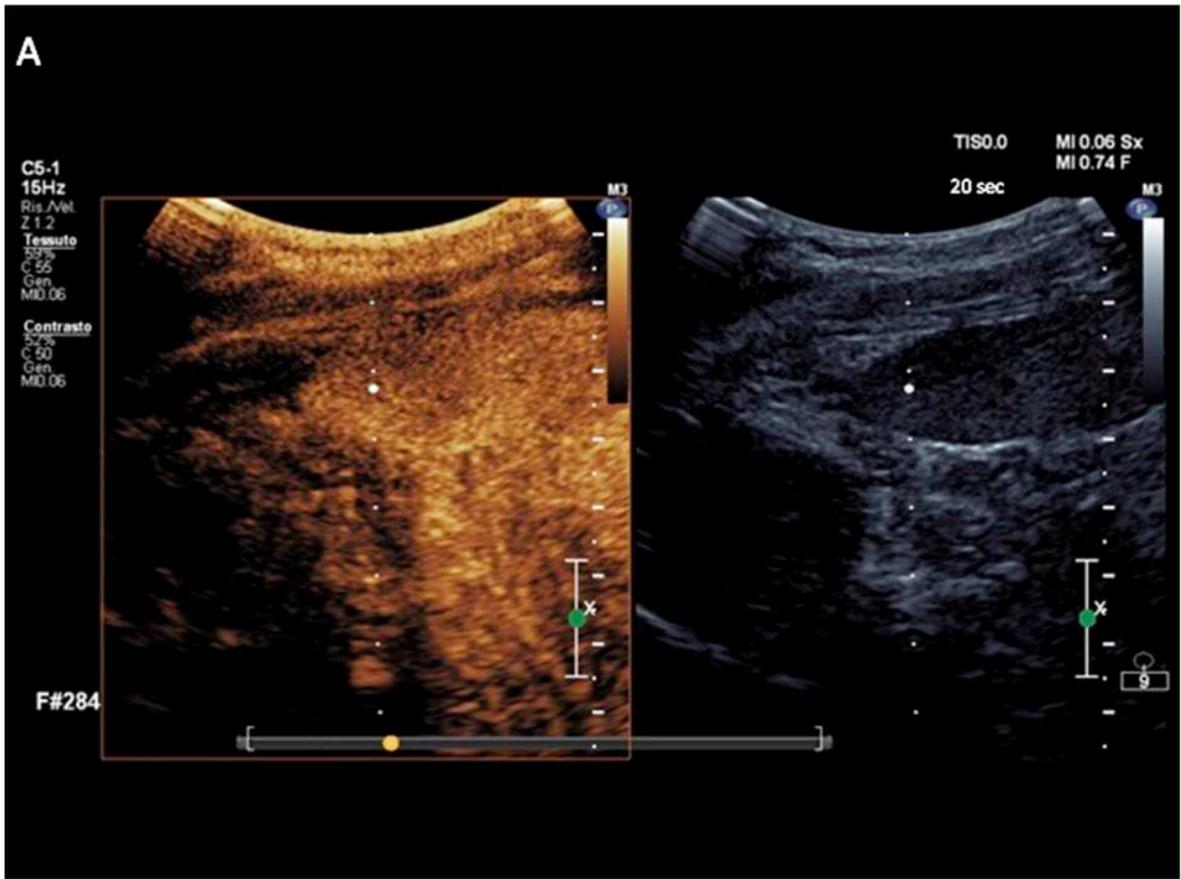


Figura 3. Caratteristiche CEUS in accordo con i criteri diagnostici. (A–C) Nodulo di LNH aggressive (DLBCL) con wash out marcato a 87 sec dall'infusione del contrasto

I linfomi di Hodgkin hanno mostrato un iso enhancement in fase arteriosa seguito da un rapido wash out che si è completato tra i 90 ed i 110 secondi in 57/60 noduli (95%). Nei 60 noduli il wash out è iniziato con un tempo mediano di 43 secondi (range 25 – 48) con un marked wash out mediano di 100 secondi (range 92 – 120) (Figura 4).



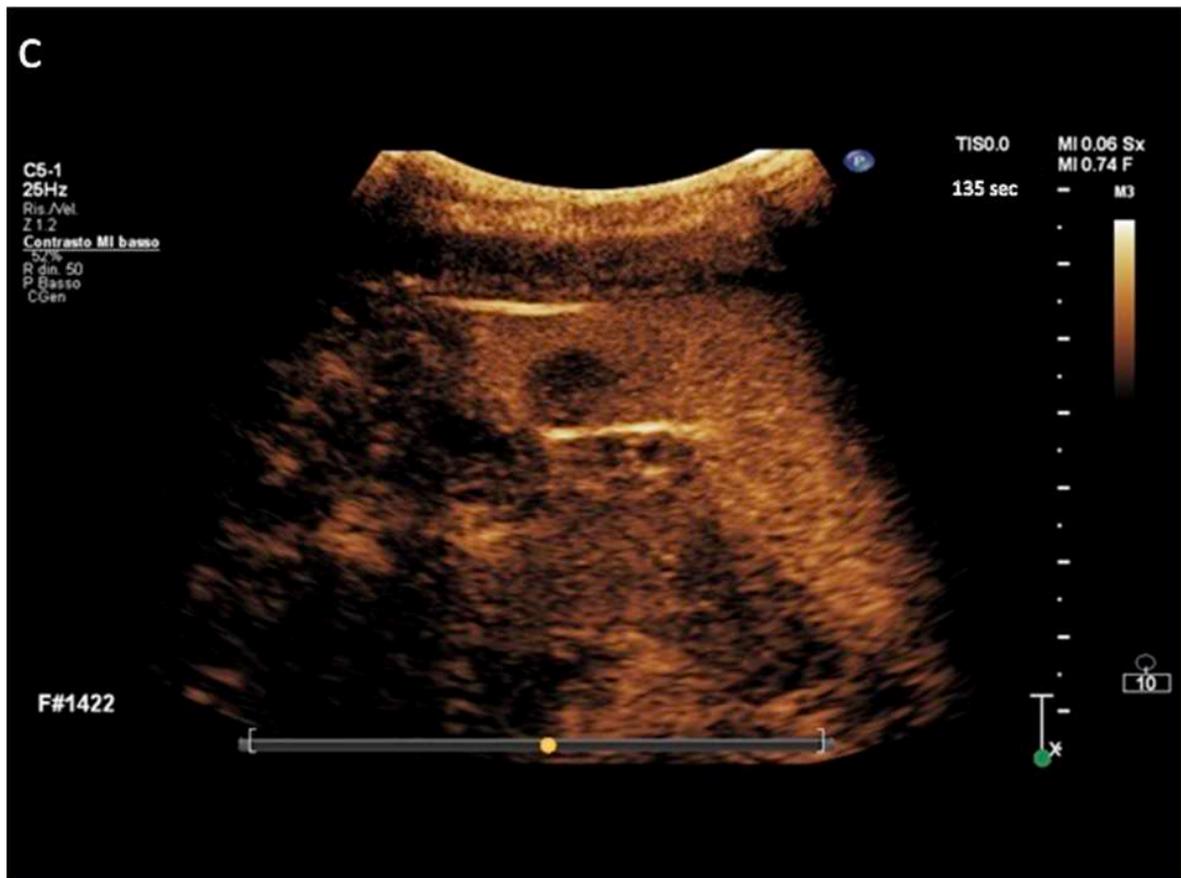
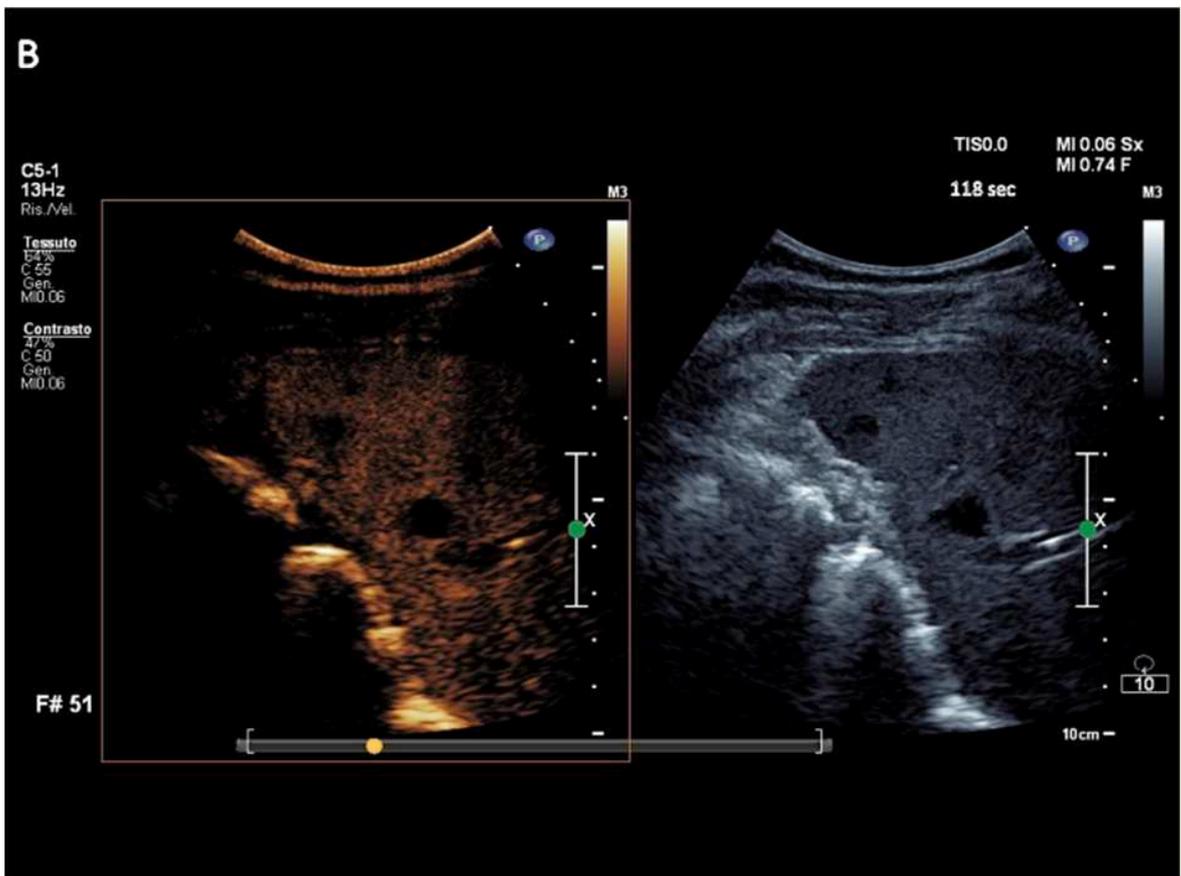
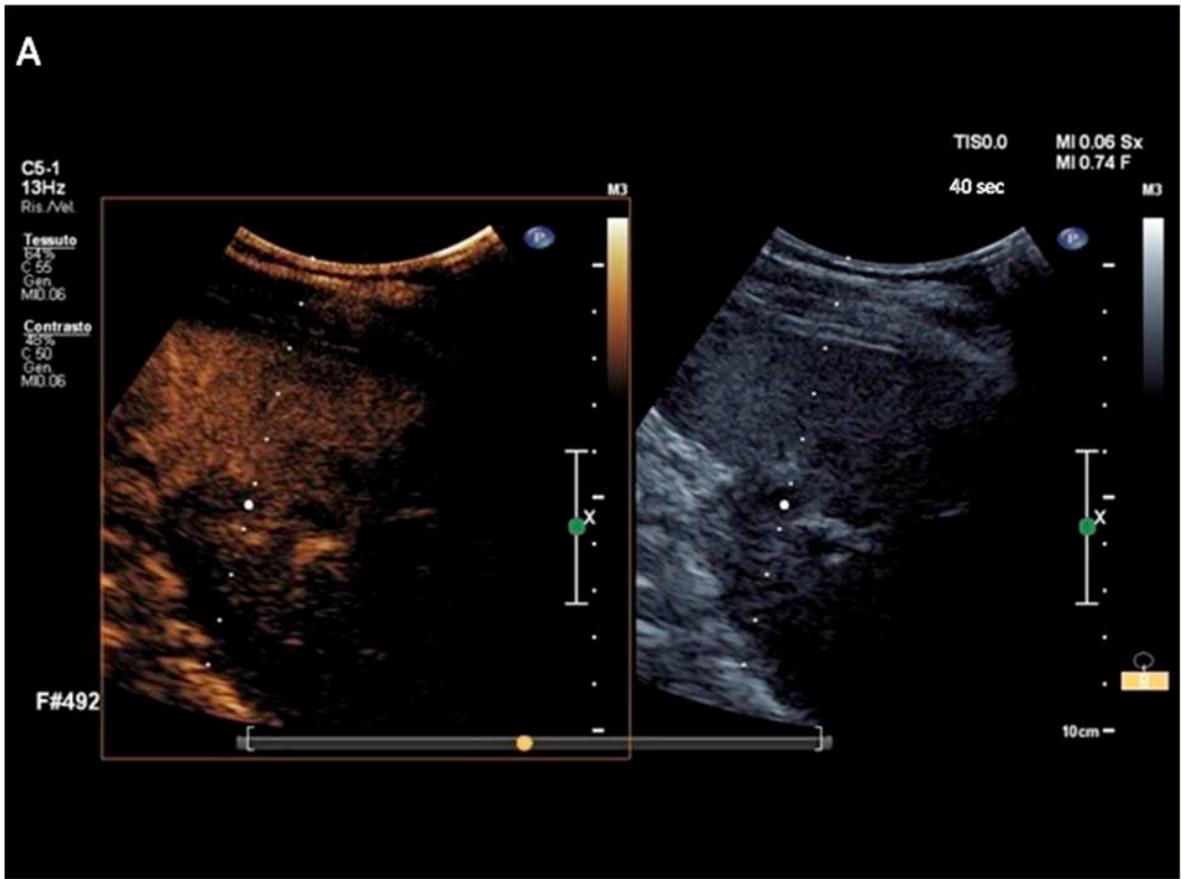


Figura 4. Caratteristiche CEUS in accordo con i criteri diagnostici. (A–C) Nodulo di LH con wash out marcato a 92 sec dall’infusione del contrasto

Infine, i linfomi indolenti hanno mostrato un iso enhancement in fase arteriosa seguito da un inizio di wash out che è diventato marked oltre tra i 110 e 120 secondi in 10/12 noduli (83%). Nei linfomi indolenti il wash out è iniziato dopo una mediana di 44 secondi (range 41 – 59) con un marker wash out mediano di 114,5 secondi (range 101 – 120) (Figura 5).



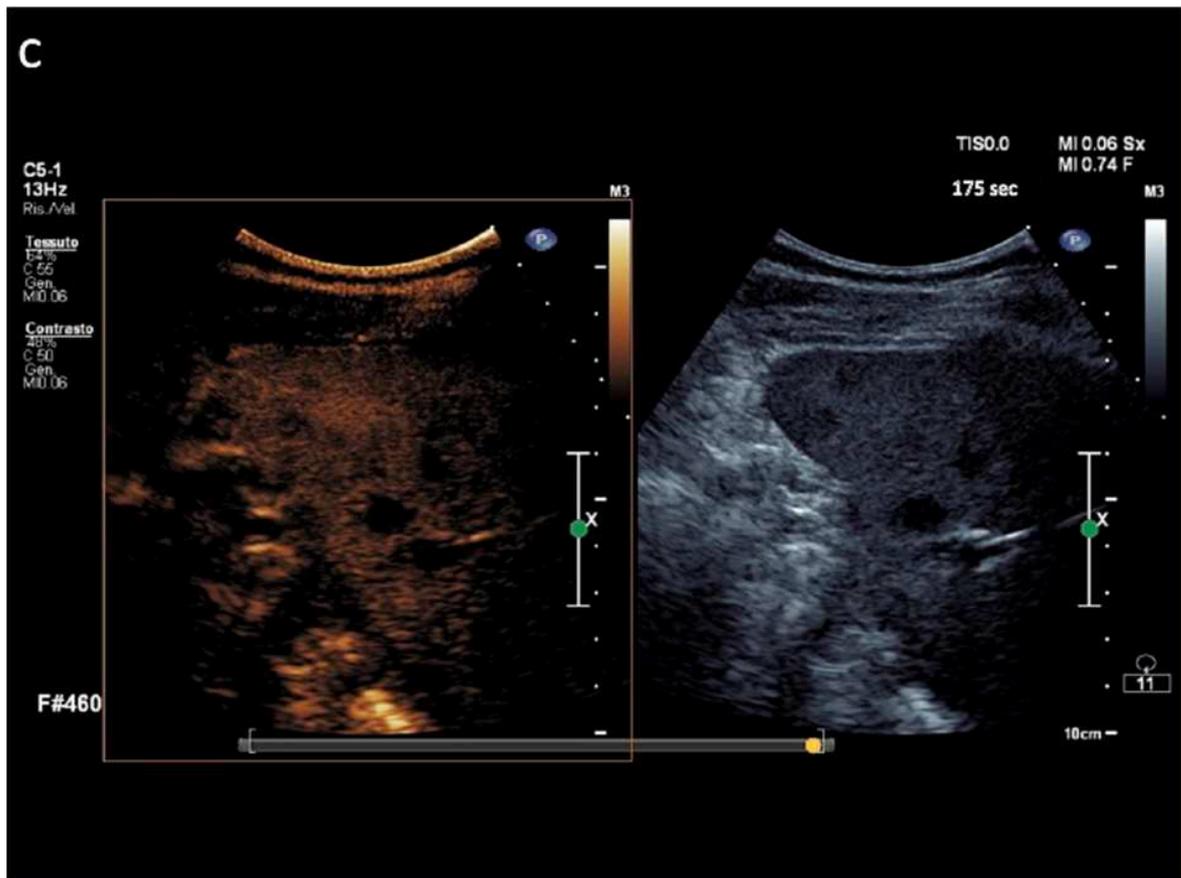
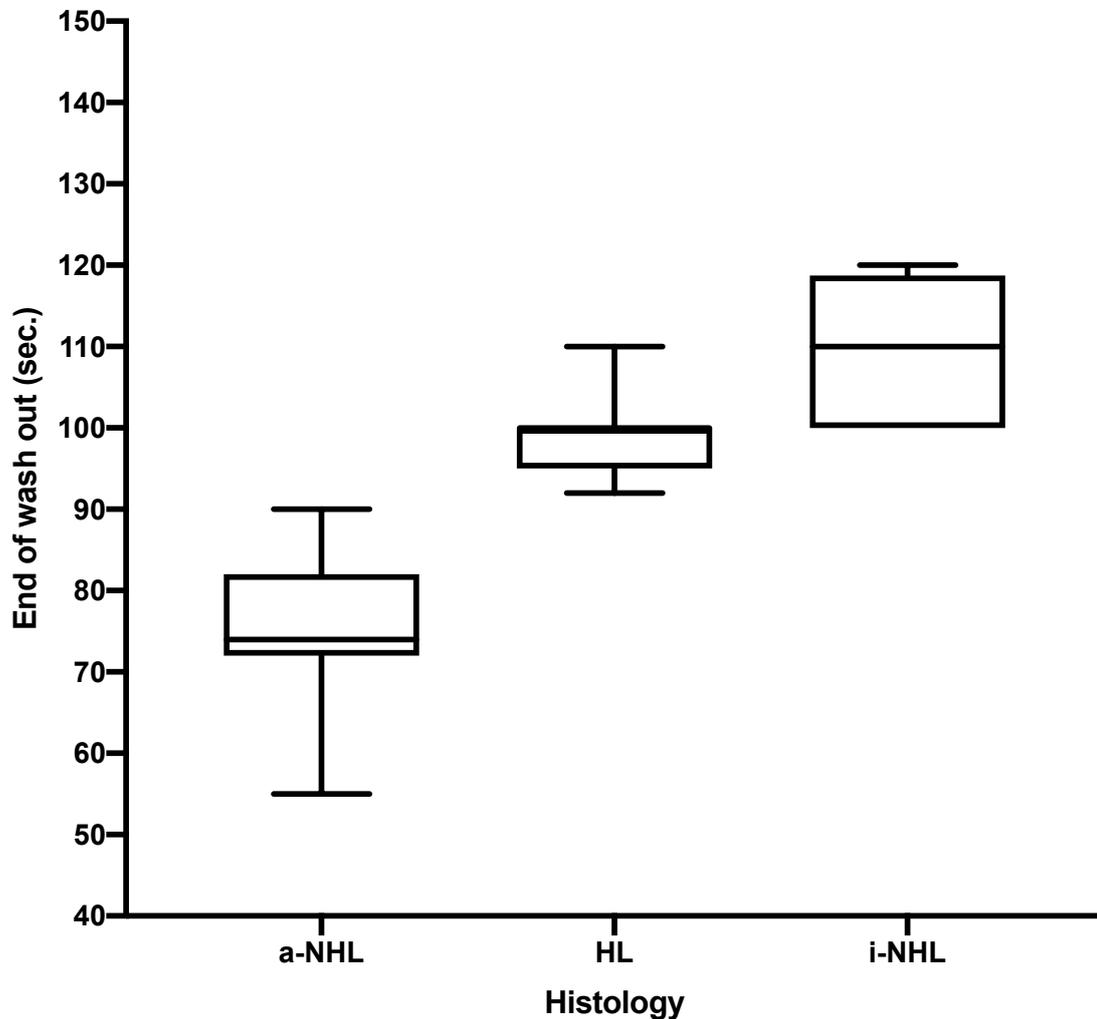


Figura 5. Caratteristiche CEUS in accordo con i criteri diagnostici. (A–C) Nodulo di LNH indolente (LNH follicolare grado 1-2) con wash out marcato a 118 sec dall’infusione del contrasto

Le caratteristiche CEUS dei tre istotipi sono quindi riassunte nella tabella 4.

Tabella 4. Caratteristiche CEUS nei tre istotipi di linfoma		
	Arterial phase	Venous parenchimal phase
LNH aggressivi	Iso-enancement	Marked ipo-enancement (marked washout) Timing < 90 sec
LH	Iso-enancement	Marked ipo-enancement (marked washout) Timing between 90 – 110 sec
LNH Indolenti	Iso-enhancement	Marked ipo-enancement (marked washout) Timing between 110 -120 sec

Analizzando il tempo di insorgenza del marked wash out in fase venosa si è visto come questo è stato sensibilmente più corto nei linfomi aggressivi rispetto ai linfomi di Hodgkin ($p<0.0001$) ed ai linfomi indolenti ($p<0.0001$) (Figura 5).



3.4 Caratteristiche della neoangiogenesi dei noduli splenici

Nei noduli splenici sottoposti a biopsia dopo splenectomia o agobiopsia è stata effettuata una valutazione immunohistochimica e morfologica della densità microvascolare (MVD). Sono stato analizzati 15 noduli di cui 7 positivi per LNH aggressivo (DLBCL), 5 per LH e 3 per LNH indolente. La densità vascolare è risultata essere più alta nei linfomi aggressivi rispetto ai linfomi di Hodgkin ed ai linfomi indolenti con rispettivamente un valore medio di $30/0,5 \text{ mm}^2$, $26/0,5 \text{ mm}^2$ e $20/0,5 \text{ mm}^2$.

Capitolo 4 Discussione

L'importanza della diagnosi di interessamento splenico nei linfomi è stata descritta in molti studi: l'infiltrazione rappresenta infatti un fattore prognostico sfavorevole in tutte le patologie linfoproliferative³⁻⁷. I pazienti con linfomi indolenti passano infatti da un approccio watch and wait ad un approccio terapeutico mentre i linfomi aggressivi da una chemioterapia standard a regimi intensificati^{3-5,7,19}. Sebbene la splenomegalia possa essere presente anche in assenza di interessamento da malattia (splenomegalia congenita o su base iperplastica), l'infiltrazione da linfoma non sempre si manifesta con aumento delle dimensioni dell'organo².

A tal fine definire un work up diagnostico che possa facilitare il riconoscimento dell'infiltrazione splenica da linfoma e che sia di facile esecuzione risulta essere fondamentale sia nel momento della stadiazione che durante il follow up.

Questa casistica rappresenta attualmente che riconosce l'utilità dell'ultrasonografia per definire la presenza di infiltrazione splenica da malattia.

Nella nostra casistica è stata valutata un'ampia serie di 260 noduli splenici validati attraverso almeno un esame di imaging convenzionale e/o con follow up clinico in quei noduli che non è stato possibile sottoporre a biopsia diretta. La CEUS in questi casi è stata capace di identificare la presenza di linfoma a livello splenico con eccellente accuratezza.

Il segno caratteristico di presenza di malattia è risultato essere l'iso enhancement in fase arteriosa seguito da un rapido (<60 sec) e marcato (<120 sec) wash out. Tre istotipi sono stati quindi analizzati per valutare la differenza di comportamento del mezzo di contrasto in base all'istologia. La totalità delle forme aggressive ha mostrato la comparsa del wash out marcato in un tempo < 90 sec con un PPV del 100% (95% IC: 97-100%). La maggior parte dei linfomi di Hodgkin ha mostrato la comparsa del wash out marcato tra 90 e 110 secondi con un PPV del 96,6% (95% IC: 88,3 – 99,6). La maggior parte dei linfomi indolenti hanno mostrato una comparsa di wash out tra i 110 e 120 sec con un PPC del 77% (95% IC: 46,2 – 95%)

Nell'analisi post hoc riguardante la valutazione della neoangiogenesi tumorale la mVD è risultata essere 30/0,5 mm² per i LNH aggressivi, 26/0,5mm² per i linfomi di Hodgkin e 20/0,5mm² per i linfomi indolenti. L'abbondante neoangiogenesi con proliferazione vascolare (migrazione e proliferazione cellule endoteliali) e l'abnorme vascolarizzazione (formazione di vasi con stenosi, occlusioni, dilatazioni o shunt artero-venosi) è stata

descritta come fenomeno fondamentale nella patogenesi dei linfomi²⁴. Le caratteristiche della CEUS, con la capacità di studiare la perfusione delle lesioni spleniche, permettono quindi di valutare in maniera estremamente specifica la presenza di infiltrazione da malattia. Dopo la fase arteriosa, infatti, le lesioni appaiono chiaramente caratterizzate da difetti di riempimenti (ipo enhancement) dovuto ad un wash out del mezzo di contrasto molto più rapido rispetto al parenchima circostante⁴. Ciò è dovuto alla neoangiogenesi vascolare caratterizzata da abbondante e anormale vascolarizzazione con vasi provvisti di endotelio largamente fenestrato e shunt arterovenosi che favoriscono la fuoriuscita del mezzo di contrasto.

Il nostro obiettivo era quindi di dimostrare come la CEUS permettesse di descrivere correttamente la presenza di infiltrazione da malattia. Lo studio mostra infatti come su 260 noduli a rischio di eziologia da linfoma, 56 (21%) sia stati definiti come benigni e correttamente identificati dalla CEUS e ciò porta a due considerazioni: la prima è che nei pazienti con malattia linfoproliferativa, la presenza di noduli a livello splenico non sia sempre indicativa di malattia ma che in un quarto dei casi questi noduli possano essere benigni; la seconda che la CEUS può correttamente ed accuratamente diagnosticare la benignità di noduli splenici senza ricorrere a procedure invasive o rischiose per il paziente.

I limiti principali dello studio sono caratterizzati da:

- Studio monocentrico, sebbene comunque uno studio multicentrico avrebbe come problema quello di utilizzare differenti macchinari per l'esecuzione della CEUS e sarebbe comunque gravato da una variabilità dovuta ai differenti esecutori dell'esame
- Studio retrospettivo, caratterizzato per esempio dal basso numero di lesioni da linfoma indolente che non hanno permesso di giungere a conclusioni più precise in questo setting di pazienti. Per tale motivo l'ideale sarebbe effettuare uno studio prospettivo coinvolgente differenti centri

Infine, lo studio ha come limite quello di non poter categorizzare un interessamento splenico diffuso in assenza di lesioni nodulari ed inoltre non prende in considerazione l'invasione da malattia non oncocematologica quale l'adenocarcinoma coloretale o il melanoma.

Capitolo 5 Conclusioni

In conclusione, la moderna ultrasonografia rappresenta una metodica costo effettiva come parte del work up diagnostico sulla milza nei pazienti con linfoma. Riteniamo fondamentale eseguire la metodica nei soggetti a rischio di infiltrazione splenica sia durante la stadiazione, come primo esame per riscontrare la presenza di malattia e quindi indirizzare il clinico verso un eventuale approccio biotico o modificare lo stadio e/o la terapia prevista, che durante il follow up dei pazienti aumentando quindi la possibilità di diagnosticare recidive precoci con un esame non invasivo e di facile ripetizione.

Con i limiti dello studio monocentrico e con la consapevolezza della necessità di aumentare il numero dei pazienti su cui confermare il dato, secondo la nostra opinione, la CEUS dovrebbe rientrare tra gli esami previsti nelle nuove linee guida da effettuare per il work up diagnostico del paziente con linfoma a rischio di localizzazione splenica.

Capitolo 6. Bibliografia

1. Bhatia K, Sahdev A, Reznek RH. Lymphoma of the Spleen. *Semin. Ultrasound, CT MRI*. 2007;
2. Glatstein E, Kaplan HS, Guernsey JM, Rosenberg SA. The value of laparotomy and splenectomy in the staging of Hodgkin's disease. *Cancer*. 1969;
3. Zinzani PL, Marchetti M, Billio A, et al. SIE, SIES, GITMO revised guidelines for the management of follicular lymphoma. *Am. J. Hematol*. 2013;
4. Picardi M, Soricelli A, Pane F, et al. Contrast-enhanced harmonic compound US of the spleen to increase staging accuracy in patients with Hodgkin lymphoma: A prospective study. *Radiology*. 2009;
5. Picardi M, Soricelli A, Grimaldi F, et al. Fused FDG-PET/contrast-enhanced CT detects occult subdiaphragmatic involvement of Hodgkin's lymphoma thereby identifying patients requiring six cycles of anthracycline-containing chemotherapy and consolidation radiation of spleen. *Ann. Oncol*. 2011;
6. Littooij AS, Kwee TC, Barber I, et al. Accuracy of whole-body MRI in the assessment of splenic involvement in lymphoma. *Acta radiol*. 2016;
7. Tarella C, Arcaini L, Baldini L, et al. Italian society of hematology, italian society of experimental hematology, and italian group for bone marrow transplantation guidelines for the management of indolent, nonfollicular b-cell lymphoma (marginal zone, lymphoplasmacytic, and small lymphocytic lymphoma). *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk*. 2015;
8. Chernyak V, Fowler KJ, Kamaya A, et al. Liver Imaging Reporting and Data System (LI-RADS) version 2018: Imaging of hepatocellular carcinoma in at-risk patients. *Radiology*. 2018;
9. Terzi E, Iavarone M, Pompili M, et al. Contrast ultrasound LI-RADS LR-5 identifies hepatocellular carcinoma in cirrhosis in a multicenter retrospective study of 1,006 nodules. *J. Hepatol*. 2018;
10. Tedesco G, Sarno A, Rizzo G, et al. Clinical use of contrast-enhanced ultrasound beyond the liver: A focus on renal, splenic, and pancreatic applications. *Ultrasonography*. 2019;
11. Johnson SA, Kumar A, Matasar MJ, Schöder H, Rademaker J. Imaging for staging and response assessment in lymphoma. *Radiology*. 2015;
12. Iannitto E, Tripodo C. How I diagnose and treat splenic lymphomas. *Blood*. 2011;
13. Picardi M, Pugliese N, Cirillo M, et al. Advanced-stage Hodgkin lymphoma: US/chest radiography for detection of relapse in patients in first complete remission - A randomized trial of routine surveillance imaging procedures. *Radiology*. 2014;

14. Picardi M, Gennarelli N, Ciancia R, et al. Randomized comparison of power Doppler ultrasound-directed excisional biopsy with standard excisional biopsy for the characterization of lymphadenopathies in patients with suspected lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2004;
15. Pugliese N, Di Perna M, Cozzolino I, et al. Randomized comparison of power Doppler ultrasonography-guided core-needle biopsy with open surgical biopsy for the characterization of lymphadenopathies in patients with suspected lymphoma. *Ann. Hematol.* 2017;
16. Picardi M, Giordano C, Della Pepa R, et al. Correspondence in reference to the previously published Epub manuscript by Peter Hokland et al. 'How I treat advanced Hodgkin lymphoma – a global view'. *Br J Haematol.* 2020;190:837–50. *Br. J. Haematol.* 2021;
17. Bell D, Gaillard F. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *Radiopaedia.org.* 2010;
18. Zelenetz AD, Gordon LI, Chang JE, et al. NCCN Guidelines® Insights: B-Cell Lymphomas, Version 5.2021. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* 2021;
19. Paes FM, Kalkanis DG, Sideras PA, Serafini AN. FDG PET/CT of extranodal involvement in non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin disease. *Radiographics.* 2010;
20. Sangiorgio VFI, Rizvi H, Padayatty J, et al. Radiologically guided percutaneous core needle biopsy of the spleen: a reliable and safe diagnostic procedure for neoplastic and reactive conditions. *Histopathology.* 2021;
21. Sidhu PS, Cantisani V, Dietrich CF, et al. The EFSUMB guidelines and recommendations for the clinical practice of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in Non-Hepatic Applications: Update 2017 (Long Version). *Ultraschall der Medizin.* 2018;
22. Tzankov A, Heiss S, Ebner S, et al. Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: A high throughput study. *J. Clin. Pathol.* 2007;
23. Alberg AJ, Park JW, Hager BW, Brock M V., Diener-West M. The use of “overall accuracy” to evaluate the validity of screening or diagnostic tests. *J. Gen. Intern. Med.* 2004;
24. Menzel L, Höpken UE, Rehm A. Angiogenesis in Lymph Nodes Is a Critical Regulator of Immune Response and Lymphoma Growth. *Front. Immunol.* 2020;