

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dottorato di Ricerca in Terapie avanzate biomediche e chirurgiche

Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia

TESI DI DOTTORATO

“Valutazione del DNA tumorale circolante come malattia minima residua per la gestione dei pazienti con Linfoma di Hodgkin: sviluppo di un pannello genico customizzato.”

36° Ciclo di Dottorato in terapie avanzate biomediche e chirurgiche

RELATORE

Ch.mo Prof. Fabrizio Pane

CANDIDATA

Dott.ssa Claudia Giordano

Indice

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il linfoma di Hodgkin	
1.1.1 Eziologia, patogenesi, classificazione istologica e biologia molecolare	3
1.1.2 Clinica, diagnosi, stadiazione e prognosi.....	14
1.2 Il ruolo della FDG-PET/TC nella stadiazione e risposta al trattamento.	
1.3 Approccio terapeutico di prima linea per gli stadi precoci ed avanzati	
1.3.1 Approccio terapeutico sperimentale di prima linea nei pazienti con stadio avanzato.	
1.4 La valutazione e il monitoraggio della risposta al trattamento.....	19
1.4.1 L'accuratezza diagnostica della FDG-PET e la valutazione istologica secondo agobiopsia linfonodale.....	
1.4.2 Approcci sperimentali per la valutazione della risposta al trattamento e del monitoraggio: lo studio molecolare.....	
1.4.2.1 Esperienze con materiale in formalina.....	
1.4.2.2 Esperienze sulla biopsia liquida.....	
1.5 La biopsia liquida come tool prognostico nel linfoma di Hodgkin	
2. SCOPO DELLO STUDIO	39
3. MATERIALI E METODI.....	40
3.1 Protocollo fase di validazione.....	40
3.2 Procedure operative: fase di validazione	40
4. RISULTATI	42
4.1 Il disegno del pannello: reference range dei geni coperti.....	42
4.2 Risultati metodologici dell'analisi dei campioni di plasma.....	45
4.3 Tossicità, riduzione della dose e rinvii del trattamento	49
5. DISCUSSIONE	52
6. CONCLUSIONI	56
7. BIBLIOGRAFIA.....	5

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Linfoma di Hodgkin

Il Linfoma di Hodgkin rappresenta lo 0.6% di tutte le forme tumorali maligne a livello mondiale.¹

In Europa si registra un'incidenza annuale di 2.3 nuovi casi/100.000 abitanti e in Italia di 2.5 casi su 100.000, secondo i dati del 2012 dell'EUCAN (European Cancer Network), (Tabella 1).²

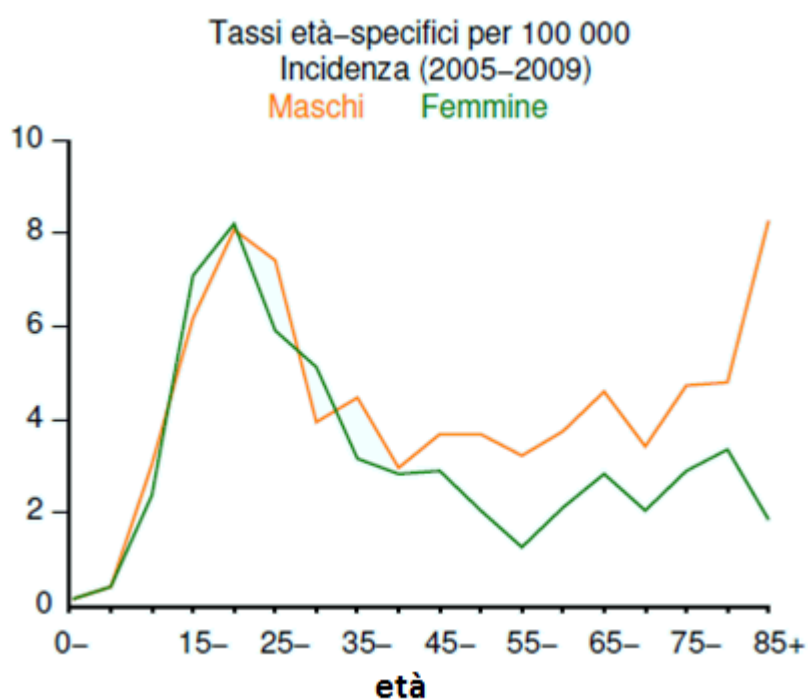
Tabella 1: Stime di incidenza, mortalità e prevalenza per il Linfoma di Hodgkin nel 2012

Country	Incidence		Mortality		Prevalence		
	Number	Rate	Number	Rate	1-year	3-year	5-year
 Europe	17584	2.3	4622	0.5	13027	37232	59817
 Italy	1584	2.5	422	0.5	1186	3384	5430

Fonte: Studio dell' EUCAN per International Agency for Research on Cancer (WHO), 2012. (Age Standardised Rate per 100,000).

In Italia, nel periodo 1998-2002 il linfoma di Hodgkin (LH) ha rappresentato sia tra gli uomini che tra le donne lo 0,5% di tutti i tumori diagnosticati e ha causato lo 0,2% del totale dei decessi tumorali in entrambi i sessi. La sua rilevanza è maggiore nelle fasce di età più giovani (0-44 anni), in cui costituisce la quarta sede per frequenza e rappresenta il 5,8% del totale dei tumori nei maschi e il 3,6% tra le femmine. La curva di distribuzione per età mostra un tipico andamento bimodale con il primo picco di incidenza che si registra in giovane età (circa 20 anni) seguito da un secondo picco in tarda età, dopo i 65 anni, (Figura 1)³.

Figura 1



AIRTUM, Associazione Italiana Registri Tumori

Per quanto riguarda l'andamento nel tempo, l'incidenza del linfoma di Hodgkin non presenta un chiaro trend anche se, secondo un rapporto del 2006 dell'AIRTUM, sembra aumentare nel tempo almeno nelle donne, mentre la mortalit    in costante riduzione.

1.1.1 Eziologia, patogenesi, classificazione istologica e biologia

L' eziologia del linfoma di Hodgkin non è del tutto compresa. Osservazioni epidemiologiche e di biologia molecolare dimostrano in circa il 50% dei casi di linfoma di Hodgkin l'integrazione del genoma del virus di Epstein-Barr, dato che porta ad ipotizzare una correlazione patogenetica tra infezione ed insorgenza di LH. È possibile che sia proprio la presenza di questo virus nelle cellule neoplastiche che determina l'attivazione costitutiva del pathway di NF-kB causando l'evasione di tali cellule dal processo di apoptosi⁴. Le cellule neoplastiche EBV positive esprimono un pattern di marcatori virali come LMP1, LMP2a e EBNA1. Invece nei pazienti EBV negativi si è ipotizzata la presenza di un secondo agente infettivo capace di fungere da agente causativo senza però che questo sia stato rilevato⁵. È stata inoltre descritta una familiarità per la malattia. Il rischio stimato di contrarre la malattia per i familiari dei pazienti affetti è da tre a nove volte maggiore, ciò conduce all' ipotesi che un'esigua proporzione di casi (5%) sia la conseguenza di un disordine ereditario⁶. Purtroppo, fino ad ora, nessun meccanismo ereditario è stato identificato. Risulta comunque consistente l'associazione tra certi allotipi HLA e il rischio di LH, specialmente HLA-A1 e in misura minore HLA-B5, HLA-B8 E JLA-B18⁷. Le immunodeficienze sono, invece, fattori di rischio ben dimostrati in letteratura. Per esempio, i pazienti HIV positivi hanno un rischio maggiore di sviluppare il linfoma soprattutto il sottotipo Depleto in Linfociti (LD) e Cellularità Mista (MC). L'incidenza del Linfoma classico è approssimativamente 50 per 100 000 persone all'anno tra i pazienti HIV positivi, da 5 a 20 volte superiore alla popolazione sana. Il linfoma a predominanza linfocitaria (LH-PL) non ha un'associazione con l'infezione da HIV sebbene siano stati riportati alcuni casi. Il comportamento clinico, inoltre, è differente, mostrandosi più aggressivo e con prognosi peggiore richiedendo un protocollo terapeutico specifico⁸.

Per quanto concerne l'**anatomia patologica**, il linfoma di Hodgkin è caratterizzato da un infiltrato eterogeneo di cellule giganti multinucleate in un background infiammatorio.

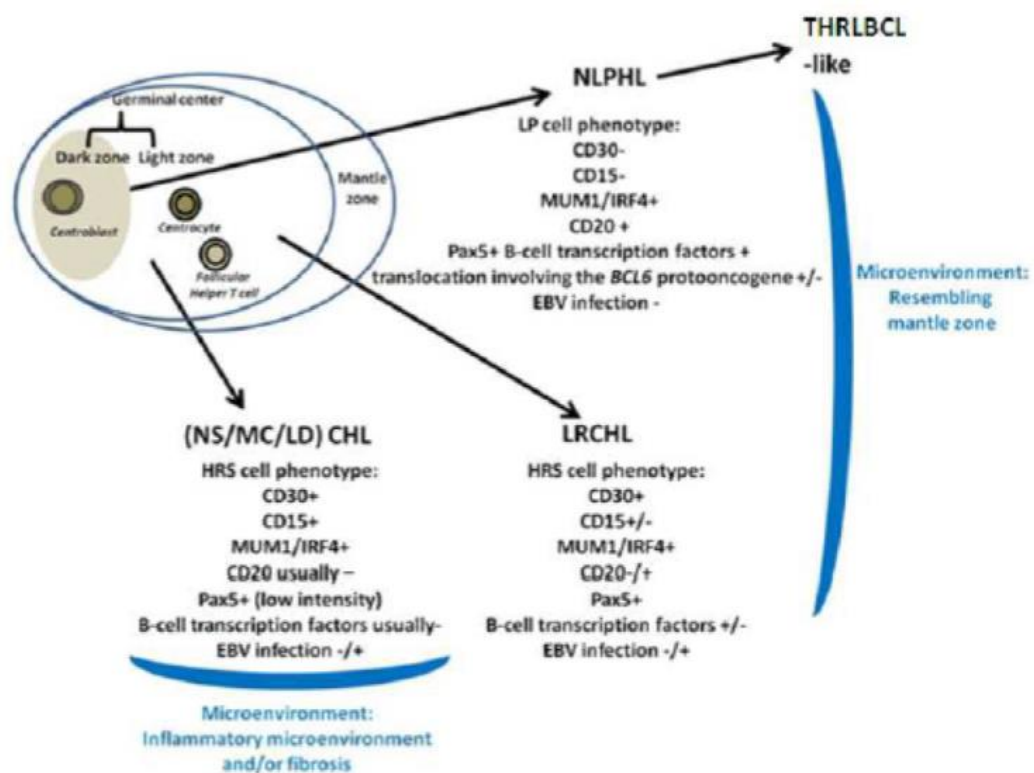
Il milieu reattivo, che può formare fino al 99% della popolazione esaminata, consiste di piccoli linfociti, istiociti, istiociti epitelioidi, neutrofili, eosinofili, plasmacellule, e fibroblasti in differenti proporzioni in base al sottotipo istologico di linfoma. Questo background infiammatorio è sostenuto da una produzione autocrina e/o paracrina di citochine come IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, FGF, TGF, TNF- α . Il rilascio di queste molecole è responsabile per la maggior parte dei sintomi riportati dai pazienti affetti dal linfoma di Hodgkin ed inoltre fornisce al clone neoplastico la capacità di sfuggire al controllo di crescita e di immunosorveglianza⁹.

La presenza di diversi tipi di cellule reattive, in particolare il numero di macrofagi infiltranti e di eosinofili può, secondo gli ultimi studi, avere un valore prognostico indipendente. Il *German Hodgkin Study Group* (GHSg) ha evidenziato, infatti, come l'eosinofilia, intesa come percentuale di eosinofili nel tessuto linfomatoso, superiore al 5% sia associata ad una prognosi peggiore tra i pazienti con diagnosi di LH classico tipo sclerosi nodulare¹⁰.

Nel 1994 il linfoma di Hodgkin è stato definito dalla classificazione Revised European-American Lymphoma (REAL) e suddiviso in due principali tipi anatomopatologici: linfoma a predominanza linfocitaria (LP-HL) e linfoma di Hodgkin comune (CHL), (Tabella 2). Il CHL include i seguenti sottotipi: sclerosi nodulare (NS-CHL), cellularità mista (MC-CHL), depleto in linfociti (LD-CHL), ricco in linfociti (LR-CHL)¹¹. Questa classificazione è stata finalmente adottata dal recente schema della WHO del 2008, revisionata nel 2016, ed ha accettato definitivamente l'entità, prima provvisoria, del linfoma ricco in linfociti¹². Con la revisione WHO 2016¹³, nel linfoma di Hodgkin a predominanza linfocitaria nodulare (NLPHL) vengono riconosciute le varianti di pattern di crescita che includono anche la quantità delle cellule tumorali (rare vs numerose) e la loro distribuzione dominante (in sede intranodulare vs extranodulare). Le varianti devono essere riportate nel referto diagnostico, in quanto sono associate a differenti connotazioni cliniche. Il NLPHL può evolvere verso una proliferazione ricca di cellule T completamente diffusa, priva di cellule dendritiche follicolari, che sarebbe coerente con un LBCL ricco in linfociti T e/o istiociti (THRLBCL). Dati recenti indicano che la progressione verso un processo con caratteristiche di THRLBCL è associata a un

decorso clinico più aggressivo e richiede una gestione diversa. Viene ribadito che il linfoma di Hodgkin classico “lymphocyte rich” (LRCHL) presenta aspetti intermedi fra il linfoma di Hodgkin a predominanza linfocitaria ed altri sottotipi del linfoma di Hodgkin classico, in termini di fenotipo della cellula tumorale e di background (Figura 2). Nel dettaglio, le cellule tumorali LRCHL presentano la parziale perdita del fenotipo a cellule B, co-esprimono CD30, CD15 e il programma trascrizionale delle cellule B¹⁴.

Figura 2: Classificazione WHO 2016



Abbreviazioni: EBV, Epstein Barr virus; HRS, Hodgkin Reed-Sternberg; NS, nodular sclerositis; MC, mixed cellularity; LD, lymphocyte depleted; LP, lymphocyte predominant. Adattata da Carbone & Gloghini, Cancer 2017.⁶

Il **linfoma di Hodgkin a predominanza linfocitaria** (LP-HL) rappresenta il 4-5% di tutti i casi di linfoma di Hodgkin e differisce molto dal tipo comune in termine di morfologia, fenotipo, genotipo e comportamento clinico, condividendo con esso solo l'esiguità della componente neoplastica. Per molto tempo è stato chiamato

“*paragranuloma nodulare*”, secondo la classificazione di Jackson e Parker, per l’architettura generale dei linfonodi costituita da noduli di varia dimensione. La sua popolazione neoplastica consiste di grandi elementi chiamati Linfociti ed Istiociti (L&H) o cellule a popcorn. Queste cellule mostrano nuclei somiglianti a quelli dei centroblasti, con un profilo polilobulare, e piccoli nucleoli (Figura 3, B).

Le cellule neoplastiche hanno un caratteristico profilo immunofenotipico, in particolare esprimono CD45, CD19, CD20, CD22, J chain, EMA e inoltre sono CD 15 e CD 30 negativi¹⁵. Le cellule L&H sono di solito negative per tutti i marcatori dell'EBV mentre la genetica sembra avere un ruolo nella malattia, in quanto le cellule neoplastiche spesso contengono riarrangiamenti dei geni delle immunoglobuline e, in due terzi dei casi, sono presenti anomalie cromosomiche.

La variante **comune** del linfoma comprende quasi il 95% di tutti i casi di linfoma ed è rappresentato dalle cellule giganti, chiamate Reed-Sternberg (HRS) o cellule diagnostiche, che rappresentano il fulcro della neoplasia. Misurano 20-60 um di diametro e presentano una larga rima di citoplasma e almeno due nuclei con nucleoli acidofili o anfofilici, coprendo più del 50% del nucleo (Figura 3, A).

Figura 3

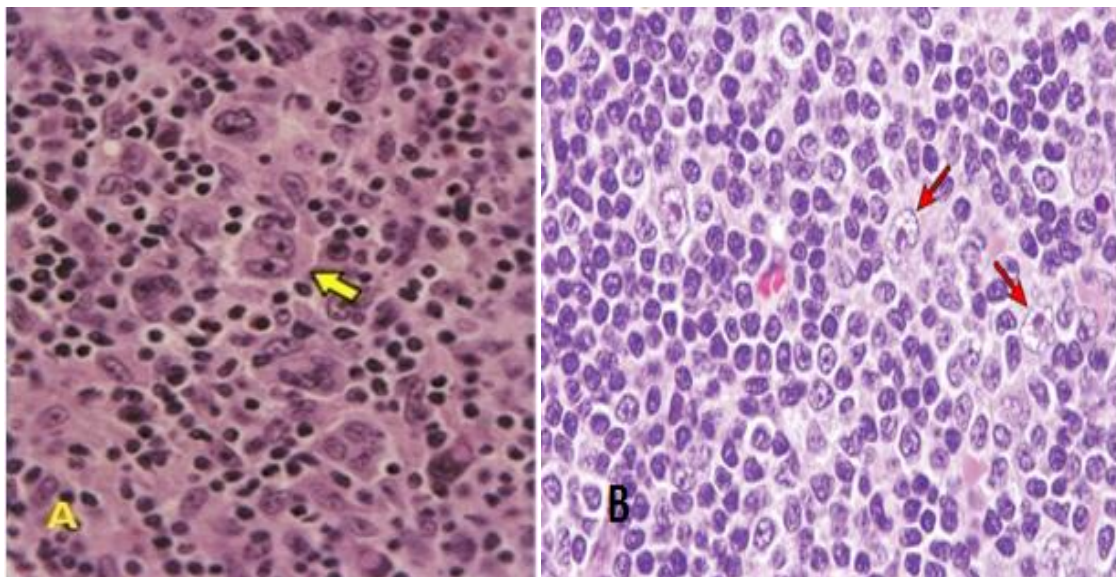


Fig 3: (A) Una tipica cellula di **Reed-Sternberg** (RS) in un milieu infiammatorio (ematossilina e eosina; original magnification, ×500). (B) LP-HL: ad alta risoluzione, qualche cellula popcorn viene visualizzata insieme a piccoli linfociti. (Giemsa; original magnification, ×450).

Studi molecolari hanno dimostrato che la maggior parte delle cellule RS, se non tutte, originano da uno stesso clone neoplastico che deriva da cellule B dei centri germinativi (in accordo con l'analisi dei riarrangiamenti VDJ delle catene pesanti dei geni delle immunoglobuline) e da cellule T in quasi il 98% e 2% dei casi, rispettivamente¹⁶. L'immunofenotipo classico è così caratterizzato: CD45-, CD15+, CD30+, CD40+ e EMA- (antigene epiteliale di membrana); nel 20% dei casi è possibile che esprimano uno o più marcatori B-associati o nel 10% marcatori T-associati, anche se più frequentemente hanno un fenotipo “*null*” (non B e non T)¹⁶. Il genoma virale di EBV è riscontrabile in circa il 50% dei casi (raro nel sottogruppo LH-SN, in circa il 40% della variante LH-RL, 70% nel LH-CM e quasi il 100% nella forma LH-DL). Le cellule del *background* infiammatorio sono costituite in maggior parte da cellule T¹⁷. Specifici fattori trascrizionali delle cellule B, Oct-2 e BOB1, possono essere d'aiuto nella diagnosi differenziale tra la forma classica in cui risultano non dosabili o poco rappresentati e la forma predominanza linfocitaria in cui invece sono positivi¹⁸. In tabella 2 si evidenziano le principali differenze anatomopatologiche e immunofenotipiche dei due sottotipi: LH classico e LH predominante linfocitario.

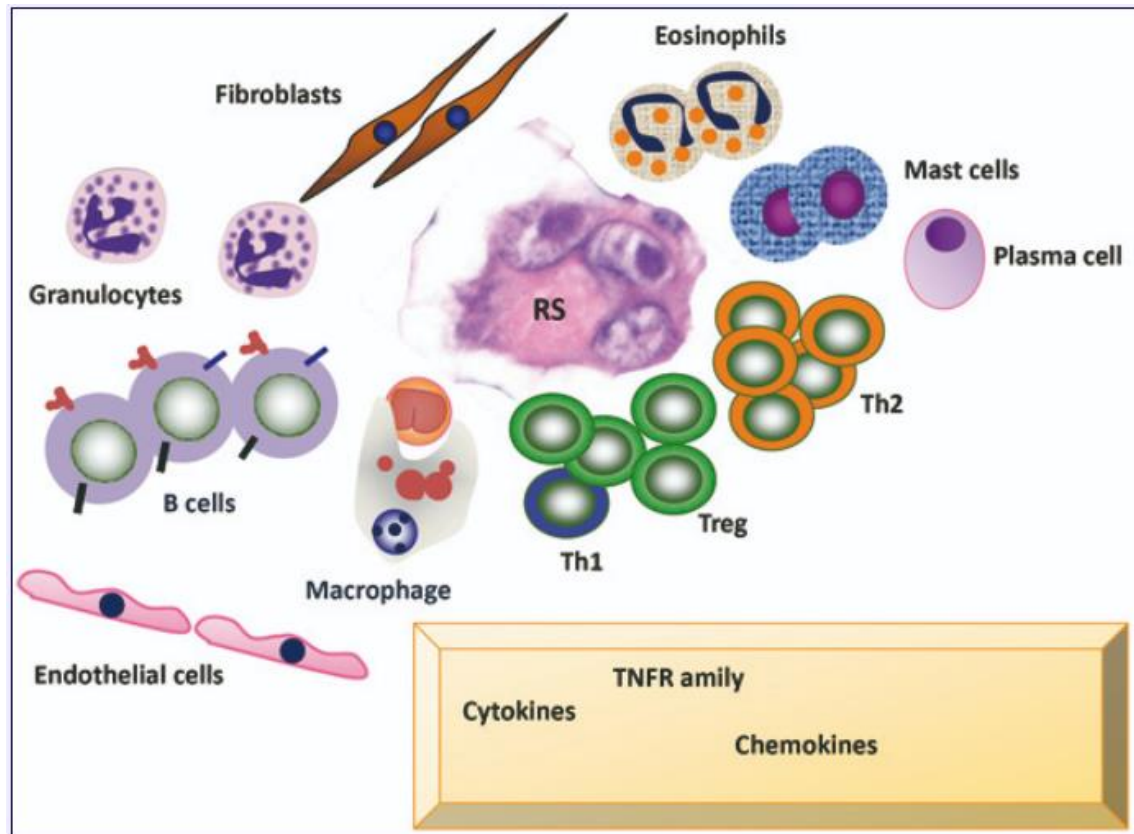
Tabella 2: *Diagnosi differenziale tra il Linfoma di Hodgkin Classico e Linfoma a Predominanza Linfocitaria*

	CHL	LP-HL
Distribuzione cellulare	Diffuso	Nodulare
Clone neoplastico	Cellule di Reed-Stenberg	L&H/cellule a popcorn
Background	Linfociti (Tcell > Bcell), istiociti, eosinofili, plasmacellule	Linfociti (Bcell > Tcell), istiociti
Fibrosi	Comune	Rara
CD45	-	+
CD30	+	—*
CD15	+/-	-
CD20	-/+ Variabile	+‡
EMA	Raro	+/-
J chain	-	+/-
EBV	+ Variabile	-
Oct-2	-	+
BOB1	-	+
Ig gene riarrangiamento	+§	+
Linfociti CD20+	Basso	Alto
Istiociti	Variabile	Qualcuno

EMA: epithelial membrane antigen; *: Debolmente positive in qualche caso; †: negativo raramente; ‡: di solito iperespresso; §: in 1–2% dei casi di riarrangiamento del recettore delle celluleT

La ridotta componente di cellule neoplastiche rappresentata nel contesto tumorale sottolinea l'importanza del microambiente nello sviluppo e nella progressione del LH (Figura 4).

Figura 4. Le cellule di RS e il microambiente



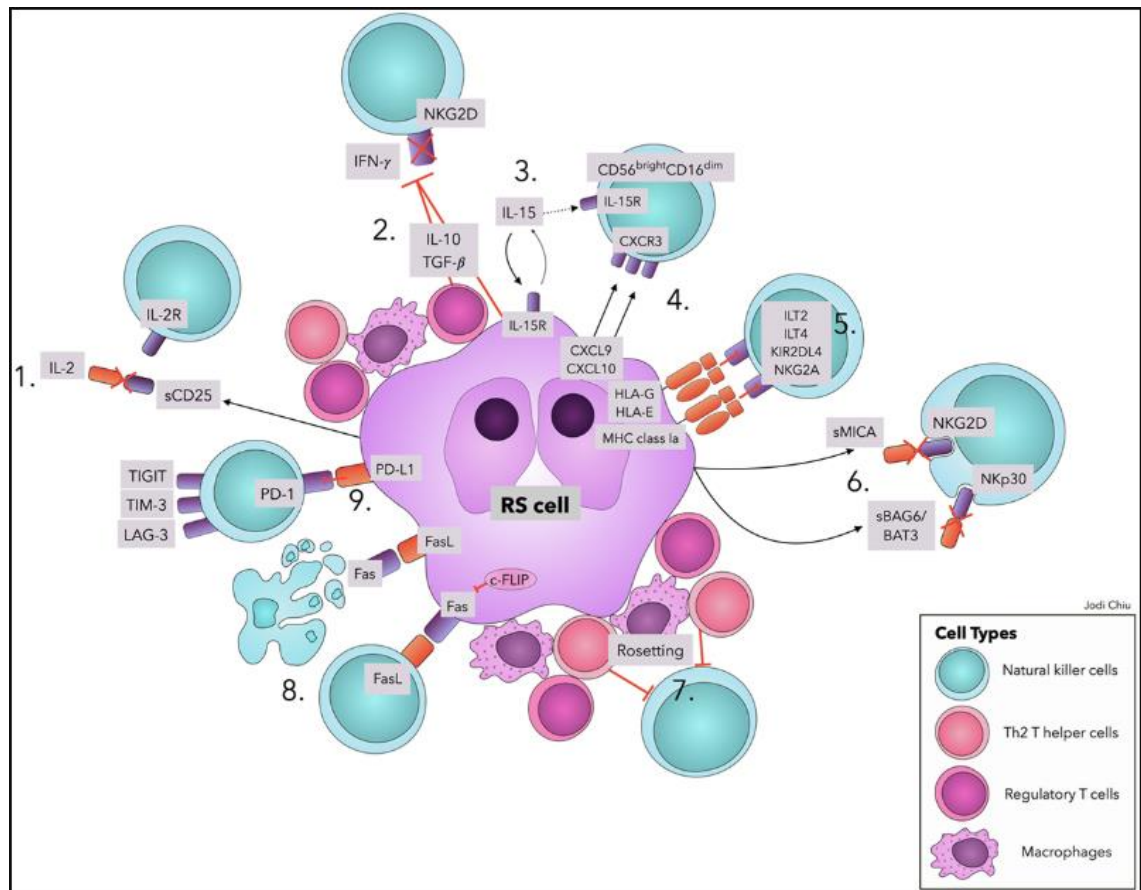
Le cellule di RS instaurano un complesso cross-talk con gli elementi non neoplastici sia attraverso interazioni cellula-cellula sia attraverso la produzione di mediatori solubili come citochine e chemochine. Tali interazioni portano sia all'amplificazione dei meccanismi di proliferazione e auto-mantenimento della cellula neoplastica sia a fenomeni di mascheramento immunologico attraverso la modulazione della risposta immune, andando ad agire sui linfociti B (soprattutto nel NPLHL) e T (helper, citotossici e regolatori) presenti nel microambiente.

In tale ambito di ricerca molte sono le nuove informazioni riguardo il ruolo svolto dai linfociti T nel microambiente del LH¹⁹.

I linfociti T del LH sono in maggior parte costituiti da linfociti Th2 e da linfociti T regolatori (Treg). Le cellule RS producono una serie di citochine e chemochine

(CCL17/TARC, CCL22, CCL5, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) in grado di attrarre le cellule Th2 e Treg, inducendo la differenziazione dei tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) verso il fenotipo Th2 e allo stesso tempo secernono una serie di fattori (galectin-1, IL-7, IL-10 e TGF- β e macrophage migration inhibitory factor [MMIF]) in grado di bloccare i linfociti Th1 e la risposta immunitaria Th1-mediata (Figura 5).

Figura 5. Il microambiente



L'identificazione e la caratterizzazione funzionale dell'antigene CD30 e dell'asse PD1/PDL1 hanno permesso di sfruttare le molecole come bersaglio terapeutico selettivo nel linfoma di Hodgkin.

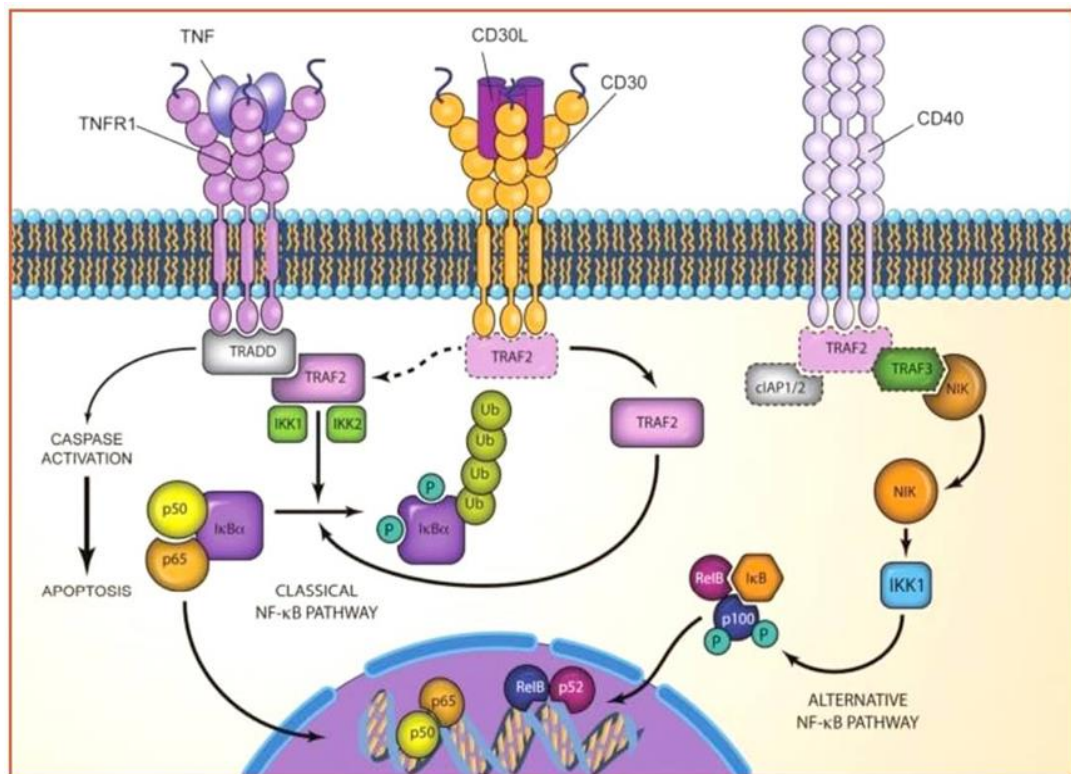
Il CD30 è una proteina transmembrana di 120-kDa appartenente alla superfamiglia del TNF, il cui gene è localizzato sul cromosoma 1p36²⁰.

La molecola mostra un dominio extracellulare simile ad altri componenti della famiglia del TNF mentre il dominio intracitoplasmatico possiede delle caratteristiche peculiari con la presenza di sequenze leganti TRAFs (TNF receptor-associated

factors) in grado sia di attivare il fattore di trascrizione NF- κ B che d'indurre i fenomeni di apoptosi (Figura 6).

Il ligando di tale antigene è il CD30L (CD153), il cui gene è presente sul cromosoma 9q33 e appartenente anch'esso alla superfamiglia del TNF. È normalmente espresso sui linfociti B e T attivati (Th1 e Th2) e a bassa intensità sui monociti e sui granulociti²¹.

Figura 6. Le vie del segnale attivate dal CD30+



Il CD30 è implicato in numerosi meccanismi tra cui i processi di proliferazione e sopravvivenza cellulare, la regolazione della produzione di citochine e l'apoptosi, sebbene molti dettagli di tali azioni siano ancora da definire. Il sistema CD30-CD30L entra nel controllo di vari aspetti della risposta linfocitaria B e T e nella regolazione della sopravvivenza timocitaria come dimostrato da studi in vitro e in modelli animali²⁰.

Le cellule di Reed-Stenberg iperesprimono, inoltre, le molecole PD-L1 e PD-L2 (Programmed Death Ligand) che si legano a PD-1 presente sulle cellule T del

microambiente, inibendone l'attivazione e la proliferazione ed evadendo così la risposta immunitaria.

In un contesto fisiologico il legame tra PD-L1/2 e PD-1 svolge un'azione inibitoria sulle cellule T attivate, limitando l'espansione della risposta immune e facilitando quindi la risoluzione del processo infiammatorio.

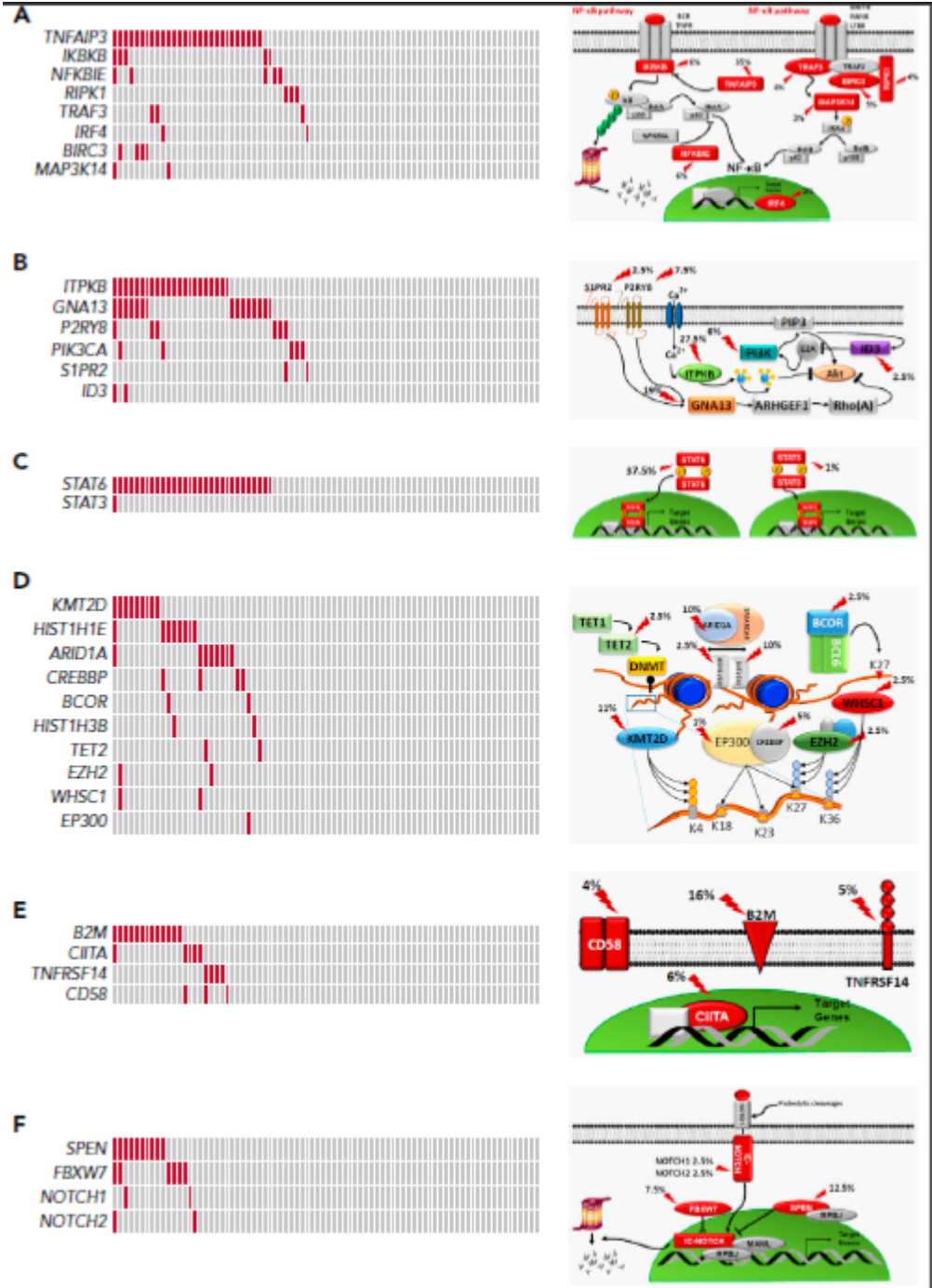
Nella forma classica di LH, alterazioni genetiche a livello del cromosoma 9p24.1 provocano un aumento dell'espressione di PD-L1 e PD-L2 e studi preclinici indicano che le cellule di Reed-Stenberg sono in grado di utilizzare il pathway di PD-1 per evadere l'attacco degli effettori immunitari. I nuovi farmaci, inibitori del checkpoint, sono volti a bloccare tale via di segnale e permetterebbero di rimodulare la risposta immune del microambiente tumorale contro la cellula neoplastica²².

Per l'identificazione di mutazioni somatiche nelle cellule RS, diversi metodi sono stati approvati per isolare le cellule tramite microdissezione da sezioni di tessuto o dal sorting cellulare di sospensioni cellulari. Studi iniziali erano focalizzati su approcci di geni candidati spesso ispirati dai risultati su precedenti analisi di linee cellulari di LH. In questi studi sono state rilevate mutazioni ricorrenti nei membri dei pathways di NF- κ B e JAK/STAT, causando o, almeno, contribuendo alla costitutiva attivazione di tali pathways.²³

La rilevanza patobiologica dell'attivazione costitutiva dei fattori NF- κ B e JAK/STAT è stata validata da studi funzionali su linee cellulari LH. B2M è stato trovato inattivato da mutazioni somatiche in 7/10 casi causando una perdita dell'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità 1 e quindi un'evasione immunitaria facilitata. Uno studio di sequenziamento di esomi su cellule RS da tumori microdissecati ha rivelato come mutazione somatica più frequente il gene STAT6 (30% dei casi).²⁴ Le lesioni in STAT6 sono mutazioni tipo gain-of-function. In totale quasi il 90% dei casi di LH presentano alterazioni genetiche nei fattori del pathway JAK/STAT dimostrando il suo ruolo fondamentale nella patogenesi del LH. Un altro approccio per individuare mutazioni nel LH è l'analisi genetica delle mutazioni del DNA circolante. I geni più spesso affetti da mutazioni somatiche non sinonime sono STAT6, TNFAIP3 E ITPKB che spesso co-occorrono nello stesso paziente STAT6 e TNFAIP3 si è visto essere più spesso mutati nella forma sclerosi

modulare rispetto agli altri sottotipi rinforzando la conoscenza che i diversi tipi istologici del LH hanno profili genetici differenti²⁵ (Figura 7).

Figura 7. I pathways molecolari mutati nel LH:
NF- κ B (A), PI3K/AKT (B), cytokine signaling (C), epigenetics (D), immune surveillance (E), and NOTCH signaling (F).



Fonte: Spina, V. et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* (2018). doi10.1182/blood-2017-11-812073

1.1.2 Clinica, Diagnosi, Stadiazione e Prognosi.

La malattia esordisce generalmente con la comparsa di una linfadenomegalia che nel 70-80% si localizza a livello laterocervicale e sovraclaveare, mentre è ascellare nel 10-20% ed inguinale nel 6-10%. Raramente, invece, esordisce con localizzazione d'organo (milza 10-15%, fegato 10%, polmone 6%, scheletro 5%). Dalle sedi linfonodali più frequentemente interessate all'esordio (laterocervicali/ascellari), il linfoma tende a diffondersi con distruzione assiale, coinvolgendo per contiguità linfatica, il mediastino sino ad interessamento sottodiaframmatico. Linfadenopatie sottodiaframmatiche esclusive sono infrequenti, verificandosi in meno del 10% dei pazienti. I linfonodi superficiali risultano essere di volume aumentato, di consistenza duro-parenchimatosa, sono non dolenti, inizialmente mobili sui piani profondi e successivamente tendenti a confluire e aderire ai piani circostanti. Per quanto riguarda le linfadenopatie profonde, il mediastino viene coinvolto nel 45% dei pazienti con esordio della malattia in I/II stadio sovra diaframmatico.

La scoperta di una massa mediastinica su una radiografia del torace rappresenta il secondo tipo di presentazione d'esordio più comune. La massa può risultare piuttosto grande senza però produrre sintomi locali o al contrario, meno frequentemente, presentarsi clinicamente in maniera aspecifica con dolore retro sternale, tosse, respiro corto. La definizione di massa mediastinica o massa *bulky* varia leggermente a seconda dei criteri adottati dalle varie istituzioni: per l'*EORTC* (European Organization for Research and Treatment of Cancer) il *bulky* è una massa che abbia un rapporto con il diametro massimo trasverso trans-toracico, misurato a livello del quinto-sesto spazio intervertebrale, maggiore di 0.35. L'*UK National Cancer Research Institute (NCRI)* e il *GHS* usano come limite di significatività un rapporto > 0.33 . Infine, l'*US National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* definisce la massa bulky se il rapporto è > 0.33 o il diametro massimo è superiore ai 10 cm. In questo caso è possibile, seppur raramente, evidenziare piccole falde di versamento pleurico e/o pericardico²⁶. Fenomeni compressivi sulla vena cava superiore tali da determinare una sindrome da ostruzione sono piuttosto rari. Oltre alla tumefazione linfonodale, il paziente con linfoma può presentare sintomi sistemici come febbre,

sudorazioni notturne profuse e perdita di peso più del 10% negli ultimi 6 mesi. Queste tre manifestazioni sono contrassegnate dalla lettera B (sintomi B) -il prurito diffuso sebbene riscontrato nel 10-15% dei casi non viene più considerato tra i sintomi poiché non modifica la prognosi- mentre quando assenti si definisce *varietà A*. I sintomi B sono presenti in meno del 20% dei pazienti in stadio I e II ma fino al 50% negli stadi avanzati. I pazienti possono presentare una varietà di sintomi aspecifici legati ad interessamento d'organo o allo sviluppo di sindromi paraneoplastiche tra cui: discomfort, dolore nelle regioni paravertebrali per grosse masse retroperitoneali, epatomegalia, splenomegalia, ostruzione ureterale, dolore a livello delle linfadenopatie in caso di ingestione di alcolici, dolore osseo (l'osso è coinvolto nel 15% dei casi di LH ²⁷), ipercalcemia, anemia ed eosinofilia.

Il decorso clinico del sottotipo Predominante Linfocitario risulta essere più indolente di quello del Linfoma classico: sono più frequenti le presentazioni ad uno stadio precoce e più frequentemente i pazienti non riferiscono sintomi sistemici ma solo una linfadenopatia. In Tabella 3 sono riportate le principali differenze nella clinica del Linfoma classico e del Linfoma a Predominanza Linfocitaria, secondo i dati ottenuti da uno studio del German Hodgkin Study Group.

Tabella 3: Differenze cliniche tra CHL e NLPHL

Patients	NLPHL (n= 394)	cHL (n= 7904)
Age, median (years)	37	33
Female (%)	25	44
Male (%)	75	56
B symptoms (%)	9	40
Early stage (%)	63	22
Intermediate stage (%)	16	39
Advanced stage (%)	21	39

Fonte: Nogová L, Rudiger T. and Engert A. "Biology, Clinical Course and Management of " Nodular Lymphocyte- Predominant Hodgkin Lymphoma". GHS ; ASH Education Book January 1, 2006.

La diagnosi di Linfoma di Hodgkin viene ottenuta grazie alla valutazione istologica del tessuto linfonodale coinvolto. È possibile adottare quali procedure di raccolta del tessuto la biopsia escissionale piuttosto che l'agobiospia ottenuta con guida ecografica. Prima di iniziare il trattamento, è necessario definire lo stadio clinico e la presenza di comorbidità sulla base di:

- Anamnesi e esame obiettivo
- Emocromo, velocità di eritrosedimentazione, LDH e profilo biochimico
- Definizione dello status sierologico per HIV/EBV/HBV/HCV/HSV
- Radiografia del torace
- PET-TC total body con ¹⁸Fluorodeossiglucosio
- Biopsia ossea e agoaspirato midollare
- Valutazione preliminare della funzionalità cardiaca, polmonare e tiroidea (in vista dell'utilizzo di schemi terapeutici includenti le antracicline, la bleomicina e la radioterapia).

Negli ultimi anni la PET ha assunto un ruolo fondamentale, sia nella stadiazione perché si affianca una valutazione qualitativa a quella quantitativa della TC, sia nella terapia. Infatti, sono in corso trials clinici sulla Pet ad interim, ossia si valuta una prima risposta dopo l'erogazione della metà dei cicli di terapia previsti e in base alla captazione si definisce la necessità di shiftare ad un'altra terapia più efficace.

Una accurata valutazione dell'estensione della malattia (stadiazione clinica) è alla base della definizione prognostica e dell'impostazione della strategia terapeutica. In questo contesto è stata proposta una classificazione in stadi (Conferenza di Ann Arbor 1971) basata sul concetto che il linfoma di Hodgkin, dopo l'insorgenza a livello linfonodale, tende a mostrare una diffusione per contiguità linfatica è soltanto successivamente, può mostrare una diffusione in sedi extralinfatiche.

La stadiazione di Costwold, sovrapponibile a quella di Ann Arbor, è stata introdotta nel 1989 ed è basata non solo sulla stadiazione clinica ma anche sul volume globale del tessuto linfomatoso e della sua possibile estensione extra nodale (tabella 4)²⁸.

Tabella 4: Stadiazione secondo Ann Arbor/Costwold

Stadio	Sedi coinvolte
I	Una singola regione linfonodale (I) o un unico sito extralinfatico (I _E)
II	Due o più regioni linfonodali dallo stesso lato del diaframma (II) un'estensione locale extralinfatica in aggiunta a una o più regioni dallo stesso lato del diaframma (II _E)
III	Regioni linfonodali da entrambi i lati del diaframma che potrebbero essere accompagnati da un'estensione locale extralinfatica (III _E)
IV	Interessamento diffuso di uno o più organi o siti extralinfatici
Fattori aggiuntivi:	A= assenza di sintomi sistemici B= presenza di almeno uno dei seguenti sintomi nei precedenti sei mesi: perdita di peso superiore al 10%; febbre superiore ai 38 °C; sudorazioni notturne ricorrenti E= indica estensione extranodale localizzata da una tumefazione linfonodale (la localizzazione all'anello del Waldeyer è linfonodale nel LH e extranodale nei LnH). Bulky: una singola massa che presenta il diametro maggiore superiore ai 10 cm o una massa mediastinica che eccede di un terzo il massimo diametro trasverso trans toracico misurato a livello del disco intervertebrale T5-T6.

Lo stadio clinico, la presenza dei sintomi sistemici B e la presenza di una malattia bulky hanno, da sempre, rappresentato i principali criteri prognostici per i pazienti con linfoma. In particolare, la distinzione in stadi operata dalla classificazione di Ann Arbor o di Costwolds ha contribuito a stratificare, ai fini terapeutici, i pazienti in stadi precoci (I-II A o B) o avanzati (III-IV A o B; I-II B con malattia bulky). Parametri clinici e laboratoristici, sono stato introdotti in differenti sistemi prognostici. Pazienti con stadio precoce vengono suddivisi in gruppo favorevole e non favorevole in accordo alla presenza di fattori di rischio definiti con lievi differenze dai gruppi GSHG²⁹ e EORTC³⁰ Entrambi usano questa classificazione per definire il programma terapeutico adatto al gruppo di rischio (Tabella 5).

Tabella 5: *Fattori di rischio per l'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) e per il German Hodgkin Study Group (GSHG).*

	Stage (Ann Arbor)			
Risk Factors	IA, IB, IIA	IIB	IIIA, IIIB	IVA, IVB
No	Early Favorable		Advanced Stages	
≥ 3* (4**) Nodal Areas	Early Unfavorable			
Elevated ESR				
Age > 50 years**				
Large Mediastinal Mass				
Extranodal Disease*				

* Fattori di rischio per il GSHG

** Fattori di rischio per EORTC

Fonte: *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014; 6: *Open Journal System Figure 2*

Inoltre, per stratificare i pazienti con stadio avanzato si utilizza uno score internazionale: **IPS** (International prognostic score), sono stati identificati sette fattori prognostici sfavorevoli, ognuno dei quali riduce la percentuale di sopravvivenza del 7-8% a 5 anni³¹(Tabella 6). I pazienti sono suddivisi in due gruppi di rischi (IPS 0-2 vs. IPS 3-5).

Tabella 6: *Fattori prognostici per advanced stages*

International Prognostic Score (IPS)	
•	Età ≥ 45
•	Sesso maschile
•	Albumina < 4 mg/dl
•	Emoglobina < 10,5 mg/dl Stadio IV
•	Leucocitosi (conta leucocitaria ≥ 15.000/mm ³)
•	Linfocitopenia (percentuale dei linfociti ≤ 8 % e/o conta linfocitaria ≤ 600/mm ³)

1.2 Il ruolo della FDG-PET/TC nella stadiazione e risposta al trattamento.

Negli ultimi anni, si è posta grande attenzione sull'utilizzo delle tecniche di imaging per la stadiazione e per la valutazione della prognosi e selezione del trattamento più adatto nei pazienti con LH. Di recente, la metodica PET combinata alla TC ha sostituito la sola TC. Nel 2009 a Deauville, in Francia, fu proposto uno score di captazione alla PET (Criteri di Deauville) per una valutazione della risposta al trattamento standardizzata. Questi criteri utilizzano una scala di cinque punti (5-PS) per valutare correttamente l'uptake del ^{18}F FDG nei siti di coinvolgimento, rispetto al mediastino e al fegato (Tabella 7)³².

Tabella 7. La scala di Deauville

Score 1: No residual uptake above the background

Score 2: Uptake $\leq$ mediastinum

Score 3: Uptake $>$ mediastinum but $\leq$ liver

Score 4: Uptake moderately increased compared to the liver at any site

Score 5: Uptake markedly increased compared to the liver at any site
and/or new lesions

La valutazione ad interim della risposta al trattamento è frequentemente praticata nella real life e nei trials clinici ed è raccomandata da alcune linee guida internazionali³³. Tali raccomandazioni sono rafforzate dalla necessità di assicurare un trattamento effettivo e ridurre la probabilità di progressione. Diversi studi hanno dimostrato che la PET ad interim (iPET) ha una grande valenza prognostica^{34,35}, sottolineando la possibilità di modificare lo schema di trattamento in itinere sulla base della risposta individuale. Bisogna però considerare che non esiste ancora una evidenza conclusiva che la modifica del trattamento secondo la iPET migliori l'outcome³⁶.

È ormai consolidata l'importanza della PET/TC nella valutazione della risposta al termine del trattamento. Nei pazienti con LH si è dimostrato come la PET/TC, praticata alla fine dello schema ABVD, abbia grande accuratezza³⁷. Diversi studi hanno dimostrato che la FDG-PET/TC ha valore prognostico nei pazienti con LH recidivato/refrattario dopo trattamento di salvataggio e precedentemente alla chemioterapia ad alte dosi ed autotrapianto³⁸ ed è superiore alla sola TC³⁹. Pazienti con PET positiva risultano avere una PFS a 3 anni del 31% rispetto al 75% di coloro che hanno una PET negativa⁴⁰. La PET può avere un ruolo nel selezionare i pazienti candidati ad alte dosi di chemioterapia ed autotrapianto e nell'identificare pazienti con prognosi cattiva che beneficerebbero di un trattamento alternativo o consolidamento. La PET può essere utilizzata anche come end point surrogato per testare l'aggiunta di terapie nuove all'attuale reinduzione⁴¹.

Inoltre, la FDG-PET/TC praticata precocemente durante trattamento secondo schema ABVD (interim PET: iPET), si è dimostrata essere il fattore predittivo più potente nel controllo della malattia a lungo termine (Progression Free Survival a 3 anni), sia negli stadi precoci che avanzati del LH. L'iPET è, infatti, ampiamente usata per predire l'outcome prima della fine del trattamento per una precoce intensificazione o décalage dello schema terapeutico. I risultati dell'iPET sono, però, inconsistenti con l'outcome finale nel 20%-30% dei pazienti che sono quindi esposti ad un sovra- o sotto- trattamento⁴².

Infatti, i valori predittivi dell'iPET oscillano in letteratura, con il miglior risultato di valore predittivo negativo (VPN) del 95% e valore predittivo positivo (VPP) dell'86%. In una recente metanalisi la sensibilità dell'iPET è riportata essere del 81% con VPN tra 86-95%, e la specificità del 97% con VPP dell'80-100%.⁴³

L'outcome finale viene, invece, valutato alla fine della schedula di trattamento secondo i criteri di Deauville, validati a livello internazionale e recentemente aggiornati³⁶.

1.3 Approccio terapeutico di prima linea per gli stadi precoci e avanzati

L'approccio terapeutico di prima linea per i pazienti con **LH classico** risulta oggi, in primo luogo, guidato dalla definizione dello stadio e dei fattori prognostici. Per i pazienti che rientrano nella categoria *early stage favorable* la combinazione del regime chemioterapico ABVD (adrimicina, bleomicina, vinblastina e daacarbazina) seguito da radioterapia *involved-field (IF)* rappresenta lo standard di trattamento più utilizzato, con un *overall survival(OS)* superiore al 90% a dieci anni⁴⁴.

L'utilizzo della sola radioterapia, a campi allargati ed alto dosaggio (40-44Gy), schema molto usato in passato, risulta inaccettabile oggi per l'alto tasso (fino al 20-40%) di neoplasie solide a cui i pazienti andavano incontro e il *relapse rate* che raggiungeva fino il 20%⁴⁵.

Possibili approcci combinati sono rappresentati da:

- Schema ABVD per 2 cicli seguito da irradiazione per una dose totale di 20 Gy (regime a più bassa tossicità)⁴⁶
- Schema ABVD per 3-4 cicli seguito da irradiazione involved field a dosi non massimali (inferiori a 30 Gy) e campi non estesi (tale approccio rappresenta quello con tassi di recidive inferiori)⁴⁷.

Il trial HD10 del *German Hodgkin Study Group* non ha dimostrato differenze in termini di OS, *Freedom From Treatment Failure (FFTF)* e *Progression Free Survival (PFS)* tra 4 e 2 cicli di ABVD e tra 20 e 30 Gy di radioterapia del tipo IF attestando quindi, per i pazienti con stadio precoce senza fattori di rischio, lo standard di 2 cicli di ABVD + 20 Gy di IFRT (Linee guida ESMO, Tabella 8)⁴⁶. Le linee guida SIE (Società Italiana dell'Ematologia, Tabella 8) prevedono che lo standard tedesco venga seguito nell'ambito di studi clinici controllati, mentre lo schema ABVD 4 cicli più radioterapia con un massimo di 30Gy quale terapia di scelta⁴⁷.

I pazienti con *unfavorable early stage disease*, in accordo ai criteri *EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer)* ricevono chemioterapia per un totale di cicli compresi tra 4 e 6, seguiti da radioterapia IF (30 Gy con eventuale *boost* di 6 Gy sul residuo *bulky*)⁴⁸.

Lo schema ABVD rappresenta lo standard chemioterapico anche per i pazienti inclusi negli *advanced stages*. Secondo le linee guida SIE i pazienti con malattia allo stadio avanzato dovrebbero infatti ricevere 6-8 cicli di ABVD come terapia di prima linea (Tabella 8).

L'EORTC H10 trial ha analizzato il confronto tra l'omissione della radioterapia involved-node e l'approccio combinato chemioterapia-radioterapia nei pazienti con PET negativa dopo 2 cicli di ABVD ma il trial è stato precocemente interrotto per l'aumento del tasso di PFS nei pazienti del braccio con sola chemioterapia⁴⁹.

Le più recenti raccomandazioni NCCN 2019 prevedono modalità di trattamento con sola chemioterapia o con successiva radioterapia in base alla valutazione tramite PET/TC ad interim⁵⁰.

Tabella 8: Linee guida Esmo, SIE e NCCN per il trattamento del Linfoma di Hodgkin in prima linea.

Front line therapy Guidelines	NCCN 2019	ESMO 2014	SIE 2009
Favorable Early Disease	2 cicli ABVD ↓ -Se PET positiva → 2 cicli BEACOPPesc e ripetere PET ABVD + ISRT 30Gy -Se PET negativa → ISRT 20Gy	2 o 3 cicli ABVD + 20 Gy IFRT o ISRT	ABVD per 3-4 cicli + 30 Gy IFRT
Unfavorable Early Disease	2 cicli ABVD ↓ -Se PET positiva → 2 cicli BEACOPPesc e ripetere PET ABVD o BEACOPPesc 2 cicli e ripetere PET -Se PET negativa → 2 ABVD + ISRT 30Gy	4 cicli ABVD o 2 cicli BEACOPPesc e 2 cicli di ABVD (< 60 anni) + 30 Gy IFRT o ISRT	ABVD per 4-6 cicli + 30 Gy IFRT
Advanced disease	2 cicli ABVD ↓ -Se PET positiva → 2ABVD + ISRT 30Gy o BEACOPPesc 2 cicli + ISRT -Se PET negativa → 4ABVD +/- ISRT su bulky	6-8 cicli ABVD o 6 cicli CICLI BEACOPP (< 60 anni) + IFRT (se residuo tumorale > 1.5 cm dopo ABVD o > 2.5 cm dopo BEACOPP)	ABVD per 6-8 cicli (BEACOPPesc in prima linea non è raccomandato al di fuori di trial controllati e mai se > 65 anni)

Combinazioni più intensive sono state sviluppate nell'ultimo decennio per migliorare l'*outcome*. Un'associazione di sette farmaci alternati per 12 giorni, il regime STANFORD V, ha prodotto un OS a 5 anni pari al 94%. Questo regime, inizialmente destinato ad essere utilizzato in associazione a trattamento radioterapico di tipo IF, non ha però portato a lungo termine dei risultati soddisfacenti per l'elevato numero di effetti avversi legati all'irradiazione. Il più recente regime utilizzato è il BEACOPP (bleomicina, etoposide, adriamicina, ciclofosfamide, vincristina, procarbazina, prednisone), introdotto dal *German Hodgkin Study Group*, nelle sue varianti *baseline* e *escalated* (Tabella 9). Trial clinici randomizzati (HD9⁵¹ e HD12⁵²) hanno comparato le due modalità del regime BEACOPP con un regime alternato COPP/ABVD dimostrando OS del 75% con COPP/ABVD, 80% con BEACOPP *baseline* e 86% con BEACOPP *escalated* ed una *FFTF* rispettivamente del 64%, 70% e 82%. Criticità del regime BEACOPP sono quelle inerenti alla sua tossicità con report di tossicità acuta ematologica, sindromi mielodisplastiche

secondarie, leucemie acute ed infertilità. La tossicità del regime BEACOPP appare particolarmente elevata nei pazienti oltre i 65 anni nei quali è proscritto (Linee guida SIE, Tabella 8). Infatti, BEACOPP non è raccomandato come terapia di prima linea data la limitata evidenza di superiorità sullo schema ABVD e data la significativa alta tossicità (Grado B). La superiorità del BEACOPP sull'ABVD in termini di PFS è presente nei pazienti con fattori prognostici negativi, cioè un IPS>3 a diagnosi. Considerando che il 60-70% dei pazienti con malattia avanzata può essere curata con ABVD da solo e quindi con minima tossicità, l'ideale sarebbe riservare lo schema BEACOPP a coloro che presentano una prognosi fortemente negativa. L'IPS d'altronde non può, sfortunatamente, avere quel valore predittivo di chemio-sensibilità tale da dirimere in maniera non equivoca le categorie di pazienti. La risposta ai primi due cicli di ABVD valutati con ¹⁸FDG-PET sembra essere un buon test di chemio-sensibilità e quindi potrebbe rappresentare una svolta nella scelta del trattamento. Molti studi sono infatti in corso per valutare una strategia di *shift* precoce verso schemi più aggressivi, si recente è stato pubblicato uno studio della FIL/GITIL in cui è stata considerata efficace e applicabile l'intensificazione con BEACOPP *escalated* qualora la PET *ad interim* risulti ancora positiva dopo 2 cicli di ABVD⁵³. Lo schema standard ABVD consta di quattro agenti non alchilanti: Doxorubicina, Bleomicina, Vinblastina e Dacarbazina. Ogni ciclo è formato da due somministrazioni erogate a distanza di 14 giorni l'uno dall'altro (Tabella 9).

Tabella 9: *Principali regimi polichemioterapici con un'associazione di agenti non alchilanti*

<i>Schema</i>	<i>Dose (mg/m²)</i>	<i>Giorni</i>
<i>ABVD</i>		
<i>Doxorubicina</i>	25	1, 15
<i>Bleomicina</i>	10 UI	1,15
<i>Vinblastina</i>	6	1,15
<i>Dacarbazina</i>	375	1,15
<i>BEACOPP*</i>		
<i>Ciclofosfamide</i>	650 (1250) e. v	1
<i>Adriamicina</i>	25 (35) e. v.	1
<i>Etoposide</i>	100 (200) e.v.	1, 2, 3
<i>Procarbazina</i>	100 p.o.	Dal 1° al 7°
<i>Vincristina</i>	1, 4 e. v.	8
<i>Bleomicina</i>	10 e. v.	8
<i>Prednisone</i>	40 p. o.	Dal 1° al 14°
<i>*Riciclo al 22° giorno. Tra parentesi la dose intensificata(escalated)</i>		

1.3.1 Approccio terapeutico sperimentale di prima linea nei pazienti con LH e stadio avanzato.

Per i pazienti con LH in stadio avanzato, il nostro centro ha condotto uno studio monocentrico, a braccio singolo, a due fasi, in aperto, di fase II, dal 1° marzo 2016 al 31 gennaio 2021⁵⁴. Abbiamo progettato lo studio per pazienti con linfomi maligni riconosciuti come FDG-avid (i.e., c-HL) in stadio avanzato.

L'obiettivo primario dello studio è stato quello di valutare se l'intensificazione precoce della terapia di prima linea mediante l'utilizzo di adriamicina liposomiale (myocet) utilizzata a dosi intensificate (MBVD-DI) in pazienti con c-HL ad alto rischio⁵⁵ avrebbe potuto aumentare l'incidenza di i-FDG-PET-negatività (secondo il sistema di punteggio a 5 punti della scala Deauville [DS] per l'interpretazione delle scansioni FDG-PET). Altri obiettivi erano il tasso di risposta globale EoT (secondo la classificazione di Lugano)⁵⁶, tossicità ematologica ed extra-ematologica (secondo i criteri del National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events versione 5.0), fattibilità (definita arbitrariamente come ≤ 5 pazienti che ricevono $< 85\%$ della dose pianificata) e PFS (definita come il tempo trascorso dal giorno 1 della prima dose di MBVD-DI alla progressione/replica della malattia [evento], alla morte per qualsiasi causa [evento] o all'ultima visita di follow-up [censura]).

Da notare che il profilo di tossicità cardiologica è stato stabilito utilizzando la valutazione ecocardiografica della deformazione miocardica longitudinale sistolica globale (GLS) e della frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) (secondo le linee guida della Task Force for Cancer Treatments and Cardiovascular Toxicity della Società Europea di Cardiologia [ESC]⁵⁷) in pazienti con c-HL sottoposti a regime chemioterapico dove i primi due cicli di terapia con MBVD-DI, che consisteva in infusioni i.v. ambulatoriali di 1 giorno di Myocet a una dose scalata di 35 mg/m², più bleomicina 10 mg/m², vinblastina 6 mg/m², dacarbazina 375 mg/m² nei giorni 1 e 14 di ogni ciclo ogni 28 giorni. Nei successivi cicli 3-6, i pazienti sono stati programmati per ricevere MBVD, che consisteva in infusioni i.v. ambulatoriali di un giorno di Myocet alla dose de-

escalation di 25 mg/m² insieme a bleomicina, vinblastina e dacarbazina al dosaggio standard nei giorni 1 e 14 di ogni ciclo ogni 28 giorni. La dose cumulativa pianificata di NPLD per i pazienti con c-HL era di 140 mg/m², somministrando una dose aumentata di 35 mg/m² nei primi due cicli, e di 200 mg/m², somministrando una dose standard di 25 mg/m² nei quattro cicli successivi. Con questo disegno, l'intensità della dose di doxorubicina liposomiale nei cicli 1-2 della serie pianificata di MBVD-DI è stata aumentata al 140% della dose standard, mentre la dose cumulativa su 6 cicli (2 cicli di MBVD-DI + 4 cicli di MBVD) è stata limitata a 340 mg/m² (113% della dose standard).

Il tasso di negatività della PET ad interim dopo i due cicli programmati di MBVD-DI nel nostro sottogruppo di c-HL è stato di circa il 97% rispetto al 77% del tasso di negatività della PET ad interim riassunto in letteratura dopo ABVD in un contesto simile di pazienti^{58,59}. Questi risultati sono stati considerati di interesse clinico da parte nostra, in quanto si è registrato un miglioramento assoluto di ≥ 20 punti percentuali di PET ad interim con risultati negativi in entrambi i tipi di linfoma in seguito al trattamento up-front con NPLD ad alte dosi.

Con la somministrazione completa di cicli di MBVD-(DI) secondo il disegno dello studio, il miglioramento dei risultati PET ad interim è stato accompagnato da ottime risposte finali. Alla valutazione dell'EoT, la percentuale di pazienti con risposte ematologiche complete è stata del 96% (27/28 casi). Il nostro studio suggerisce che la terapia up-front con dosi crescenti di doxorubicina liposomiale è economica perché riduce il numero di pazienti che rimangono con scansioni PET positive alla valutazione intermedia e quindi riduce la necessità di successivi trattamenti aggressivi, tra cui il trapianto autologo di cellule staminali del sangue periferico secondo l'approccio adattato alla PET.

1.4 La valutazione e il monitoraggio della risposta al trattamento

1.4.1 L'accuratezza diagnostica della FDG-PET e la valutazione istologica secondo agobiopsia linfonodale.

È cruciale saper individuare i pazienti refrattari al trattamento poiché necessitano di un'intensificazione con regimi di salvataggio e/o trapianto di cellule staminali. Dati sull'accuratezza diagnostica della FDG-PET di fine trattamento nel LH sono esigui [60]. Per tale motivo, il nostro centro ha praticato uno studio prospettico [61] che ha coinvolto pazienti con HL in stadio IIB/IV che dopo sei cicli di ABVD sono stati sottoposti a PET (PET6) e biopsia di taglio dell'ago centrale (CNCB) di linfonodi avidi di 2-deossi-2 [F-18] FDG. I pazienti hanno ricevuto chemioterapia/salvataggio di cellule staminali ematopoietiche autologhe ad alte dosi (HDCT/AHSCR) se la CNCB era positiva per HL, in alternativa, se la CNCB o la PET erano negative, hanno ricevuto l'osservazione o la radioterapia di consolidamento (cRT) sulle masse linfonodali residue, come inizialmente previsto. L'end-point era la sopravvivenza libera da progressione (PFS) a 5 anni. In tutto, 43 dei 169 pazienti valutabili (25%) erano PET6 positivi (DS 4, 32; DS 5, 11). Tra questi, l'istologia ha mostrato malignità (HL) nel 100% dei punteggi DS 5 e nel 12,5% dei punteggi DS 4. Quindici pazienti con biopsia positiva hanno ricevuto HDCT/AHSCR, mentre 28 pazienti con biopsia negativa, così come 126 pazienti con PET6 negativa, hanno continuato il piano originale (cRT, 78 pazienti; osservazione, 76 pazienti).

La PFS a 5 anni nel gruppo PET6 negativo, nel gruppo biopsia negativa e nel gruppo biopsia positiva è stata rispettivamente del 95,4%, 100% e 52,5%. Conclusioni: La positività al DS della PET end-of-ABVD nell'HL avanzato ha portato un certo numero di captazioni di FDG non maligne dimostrate da CNCB.

I punteggi DS 4 che sono risultati avere un'istologia negativa sembravano trarre beneficio dal continuare il piano terapeutico originale non intensivo, come indicato dall'esito positivo in oltre il 95% di essi, ottenendo una PFS a 5 anni simile a quella del gruppo PET6-negativo. Al contrario, il punteggio DS 5 ha avuto un'istologia costantemente positiva ed è stato associato a una terapia convenzionale senza

successo, che ha richiesto prontamente l'intensificazione del trattamento o approcci terapeutici innovativi.

Una review e metanalisi di Adams e Kwee ha riportato un tasso poolato di falsi positivi di circa il 35% (8-65%) [62] ottenuto da studi con conferma istologica della lesione ancora positiva alla PET finale.

Una questione ancora aperta è, infatti, la precoce identificazione di pazienti a prognosi sfavorevole per malattia chemiorefrattaria come candidati ad intensificazione di trattamento e di pazienti a buona prognosi come candidati ad una de-escalation del trattamento.

Per questi motivi, è ormai necessaria la ricerca di markers precoci e accurati che possano migliorare l'accuratezza diagnostica della FDG-PET e identificare già alla diagnosi, o poco dopo l'inizio del trattamento, pazienti con prognosi peggiore.

1.4.2 Approcci sperimentali per la valutazione della risposta al trattamento e monitoraggio: lo studio molecolare.

La ricerca sul panorama mutazionale del LH è diventata sempre più attiva negli ultimi anni. Ad oggi, la diagnosi di CHL viene effettuata mediante l'ispezione di campioni citologici, ma l'identificazione del lignaggio rappresenta una sfida aperta a causa della bassa frazione (che varia dallo 0,1 al 10,0%) di cellule tumorali Hodgkin e Reed-Sternberg mescolate a una pletora di cellule ematologiche non tumorali (ad esempio, eosinofili, macrofagi, linfociti B e T)¹⁶. In questo scenario, la profilazione molecolare è considerata una nuova arma volta a integrare la diagnosi morfologica.

1.4.2.1 Esperienze con materiale in formalina.

Ad oggi, sono stati sviluppati diversi test per eseguire di routine l'analisi molecolare nei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin. In primo luogo, *Küppers et al* si sono concentrati sulla valutazione del profilo di espressione dell'mRNA in modelli preclinici al fine di stabilire una firma comune nei pazienti con LH⁶³. Questo sforzo si è basato sull'implementazione di microarray U95A (Affymetrix

Inc.) sulla piattaforma corrispondente. L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando il software Affymetrix Microarray Suite 4.0 selezionando un cutoff arbitrario di 20 a determinare le variazioni del livello di espressione. In breve, linee cellulari di diverse neoplasie ematologiche hanno evidenziato un profilo di espressione distinto in grado di distinguere il LH dagli altri gruppi. Da notare che cinque dei geni iperespressi (PRAME, IPL, FER, Rab13 e EAR3) di un controllo positivo precedentemente rilevato sono stati confermati in campioni di tessuto di nove pazienti con LH adottando un test personalizzato di reazione a catena della polimerasi in tempo reale (RT-PCR). Allo stesso modo, *Malec et al* hanno studiato il ruolo dell'infiammazione nei pazienti affetti da LH ispezionando i livelli di citochine pro-infiammatorie in 15 pazienti con caratteristiche morfologiche eterogenee⁶⁴. In questo caso, è stato abilitato un sistema RT-PCR ottimizzato per eseguire analisi molecolari. Nel complesso, è stato identificato un pattern di espressione delle citochine abbinato tra i modelli preclinici e i campioni dei pazienti. In breve, IL-10, IL-1b, IL-15 e IL-12p35 erano espressi in modo più elevato rispetto ai campioni di controllo accoppiati. Questi dati hanno dimostrato che i LH hanno un impatto drastico sulla modulazione sia del profilo di espressione dell'mRNA delle cellule tumorali che sulle modificazioni dei livelli di citochine. Queste strategie hanno evidenziato alcune sfide tecniche e cliniche significative. In primo luogo, questi approcci tecnici sono stati in grado di funzionare con successo solo quando si partiva da campioni congelati. Inoltre, l'identificazione di *signature* di espressione non ricorrenti ha indicato che il ruolo clinico di altri biomarcatori promettenti dovrebbe essere studiato. Alla luce di queste criticità, l'implementazione della piattaforma di sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha rapidamente modificato il paradigma tecnico per la caratterizzazione molecolare dei pazienti affetti da LH⁶⁵. Recentemente, è stato validato un approccio di sequenziamento dell'intero esoma per analizzare in modo completo i profili molecolari (DNA e RNA) in un set di 10 pazienti affetti da LH. In breve, *Reichel et al.* hanno ottimizzato il flusso di lavoro tecnico di KAPA Biosystems integrato con un sistema di *sorting* al fine di migliorare selettivamente la sensibilità tecnica nelle cellule bersaglio. Sorprendentemente, in ogni caso è stato rilevato un

numero mediano di 244 mutazioni somatiche. Tra questi, B2M ha presentato diverse alterazioni molecolari che hanno inattivato la funzione proteica⁶⁶. È stato osservato che la perdita di funzione di B2M svolge un ruolo fondamentale come biomarcatore diagnostico (NS sottotipo 86/115 casi; 75%) e prognostico (l'espressione di B2M è significativamente associata allo stadio III-IV; $p = 0,001$) nei pazienti con LH. Allo stesso modo, *Mata et al.* Hanno implementato una piattaforma NGS basata su un sistema a semiconduttore per l'analisi molecolare di geni correlati al cancro adottando un pannello personalizzato integrato con una pipeline bioinformatica dedicata.⁹ Concentrandosi su 57 campioni FFPE di pazienti con LH, i geni CSF2RB, EP300, STAT6 e BTK hanno mostrato il più alto tasso di mutazione in base ai pathways più spesso deregolati nei pazienti con LH⁶⁷. In un altro esperimento, *Mata et al* hanno analizzato 35 geni per lo più mutati in 20 pazienti con LH adottando una piattaforma NGS basata su semiconduttori per una serie di campioni di biopsia FFPE originali pre-trattamento e recidiva abbinati. Nel complesso, nei campioni refrattari è stato rilevato un tasso crescente di alterazioni molecolari p53 ad alto impatto e alterazioni molecolari inattivanti nei regolatori epigenetici EP300 e CREBBP⁶⁸. Questo studio ha dimostrato l'evoluzione dinamica del panorama molecolare nei pazienti con LH dopo trattamento convenzionale.

1.4.2.2 Esperienze sulla biopsia liquida.

La biopsia liquida consiste in un prelievo di sangue venoso come modalità di campionamento facile da praticare e meno invasiva per investigare una pletora di differenti biomarcatori^{69,70}.

È stato dimostrato che i livelli circolanti di DNA tumorale (ctDNA) sono età e genere dipendente in pazienti con linfoma con un valore statisticamente significativo più alto negli stadi avanzati⁷¹⁻⁷³. Per questo motivo, le piattaforme di NGS includono un gruppo eterogeneo di sistemi di sequencing che permettono di detectare in maniera simultanea un ampio spettro di geni correlati al tumore^{70,71-74}. Uno dei metodi più frequentemente adottati è un pannello ultrasensibile basato sulla selezione ibrida

(SeqCap EZ Choice Library) sulla piattaforma MiSeq (Illumina). Questo approccio si basa sull'identificazione selettiva e sull'amplificazione di regioni esoniche e introniche che ospitano alterazioni molecolari hotspot per un particolare tipo di tumore⁷⁴⁻⁷⁶. È interessante notare che Spina et al⁷⁷ si sono concentrati sul ruolo completo della biopsia liquida nella diagnosi del CCL senza alcuna selezione HRS precedente, per l'identificazione dell'evoluzione molecolare delle cellule tumorali e la rilevazione della malattia minima residua (MRD) dopo le strategie terapeutiche convenzionali. Gli autori hanno progettato e sviluppato un pannello NGS personalizzato in grado di rilevare esoni hotspot e siti intronici in 77 geni per lo più mutati in tumori maturi a cellule B su una serie di 80 pazienti naïve e 32 recidivati o refrattari (R/R) in prima linea di terapia. Come già dimostrato in precedenza, questo approccio ha permesso l'identificazione selettiva della maggior parte delle alterazioni molecolari ricorrenti correlate al cancro a frequenze molto basse^{75,76}. L'analisi dei dati è stata ottimizzata in base alla ricorrenza delle alterazioni molecolari. In particolare, è stata presa in considerazione una frazione allelica mutante (MAF) $\geq 5,0\%$ e compresa tra l' $1,0\%$ e il $5,0\%$ rispettivamente per i geni sconosciuti e per quelli ben consolidati correlati al cancro⁷⁷. L'analisi molecolare è stata affrontata su campioni di biopsia liquida in diversi momenti clinicamente rilevanti: al basale, durante il decorso (intermedio) e alla conclusione di un regime chemioterapico convenzionale ABVD (adriamicina, bleomicina, vinblastina, dacarbazina), o alla progressione nei pazienti affetti da cHL resistente. Inoltre, per i test molecolari è stato raccolto il DNA genomico estratto dalle cellule bianche su campioni di plasma abbinati e dalle cellule neoplastiche su campioni di tessuto senza alcuna selezione di cellule HRS. In particolare, in campioni di DNA libero da cellule (cfDNA) di 15 pazienti affetti da cHL sono state riscontrate alterazioni driver di TNFAIP3, ITPKB, GNA13 e B2M non ancora riportate in letteratura. È stato osservato uno spettro molecolare simile tra i pazienti affetti da cHL di nuova diagnosi e quelli recidivanti; questo punto ha dimostrato la fattibilità tecnica di questo approccio per l'identificazione selettiva di alterazioni molecolari insediate nelle cellule tumorali. Inoltre, anche i campioni biotici hanno evidenziato una concordanza di risultati in base alle alterazioni rilevate su cfDNA (87,5%). Sulla

base di questi risultati, la NGS ha evidenziato una mediana di cinque mutazioni somatiche nell'81,2% dei casi di LMC di nuova diagnosi; è stata poi osservata una MAF mediana del 5,5%, mentre la maggior parte delle alterazioni molecolari è stata rilevata all'1,0% (87,3%)⁷⁸. Inoltre, a diversi gruppi istologici corrispondono specifici profili molecolari. Inoltre, è stata analizzata una serie longitudinale di n=41 campioni di plasma di 13 pazienti affetti da cHL recidivato/refrattario per valutare l'evoluzione clonale dei tumori maligni. In questo contesto, è stata osservata una modifica del profilo molecolare nei campioni recidivanti rispetto al campione iniziale, dimostrando l'impatto della terapia sulle cellule tumorali⁷⁸.

Camus et al., in una serie retrospettiva di n=60 pazienti con cHL di nuova diagnosi è stata valutata utilizzando una piattaforma NGS basata su semiconduttori che copre le alterazioni molecolari hotspot in geni cardine per i pazienti affetti da neoplasie ematologiche⁷⁹. L'analisi dei dati è stata effettuata filtrando il MAF al di sotto dello 0,5%. Complessivamente, è stato identificato un tasso di concordanza dell'83,3% (61 varianti) tra i campioni di tessuto e i campioni di cfDNA abbinati; inoltre, è stata osservata una maggiore quantità di cfDNA nei pazienti con un esito clinico favorevole; infatti, è stata osservata una correlazione statisticamente significativa con il volume del tumore⁷⁹.

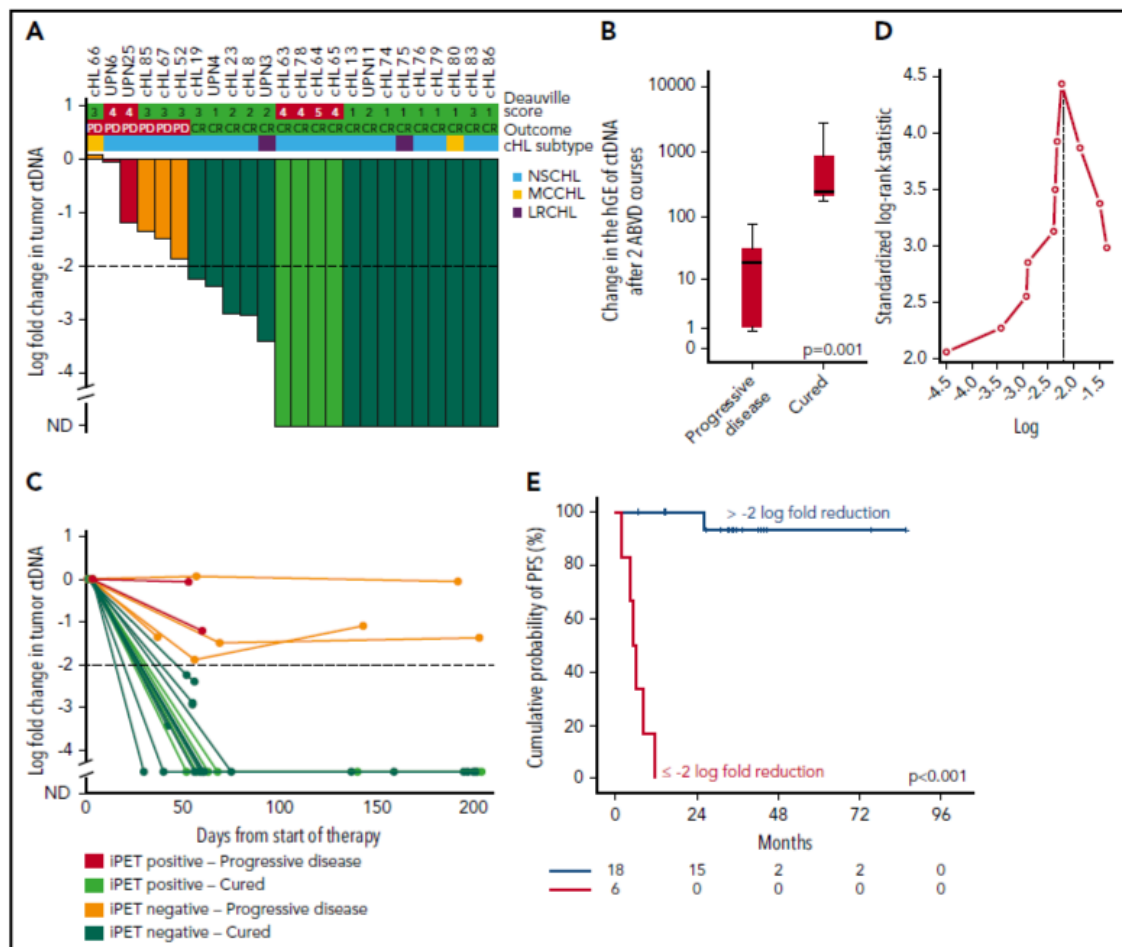
1.4 La biopsia liquida come tool prognostico nel linfoma di Hodgkin

Con la consapevolezza che il DNA tumorale viene rilasciato in piccole quantità nel circolo sanguigno, si è avanzata la proposta di monitorare i pazienti con linfoma di Hodgkin tramite valutazione NGS su sangue periferico e di correlare la carica mutazionale con la risposta alla PET/TC. Nel 2018 Rossi e colleghi hanno dimostrato che la genotipizzazione del linfoma di Hodgkin può complementare, ma non sostituire ancora, l'analisi del tessuto diagnostico essendo il ctDNA rappresentativo dell'eterogeneità del linfoma. Aver accesso al circolo ematico ha anche il chiaro

vantaggio di avere campioni serati durante il monitoraggio dei pazienti sottoposti a chemioterapia e riconoscere mutazioni emergenti resistenti alla terapia in tempo reale⁷¹.

Nel LH dopo due cicli di terapia si può già misurare il cambiamento del ctDNA che si associa al Event-Free-survival (EFS) e OS. Una riduzione logaritmica di 2 nei livelli di ctDNA dopo due cicli è associata ad un eventuale remissione completa e cura. DI contro, una riduzione di meno 2-logaritmi dopo due cicli è associata con un'eventuale progressione. La quantificazione del ctDNA accoppiata alla PET/TC migliorare l'accuratezza della valutazione di malattia residua ad interim comparata con la sola PET/TC. Infatti, pazienti che sono considerati come positivi ad interim secondo la PET/TC sono in realtà curati a fine trattamento correlando di più con un risultato negativo di ctDNA ricevuto già ad interim. Questi risultati forniscono l'ipotesi che il ctDNA possa complementare la valutazione della risposta con la sola PET²⁵ (Figura 8).

Figura 8. ctDNA e risposta alla terapia nei LH



A) Waterfall plot della modifica in logaritmi del ctDNA dopo 2 cicli di ABVD in 24 pazienti con LH stadio avanzato. advanced stage cHL cases. (B) Box plot del ctDNA dei pazienti che hanno presentato progressione di malattia versus coloro che sono andati in remissione (C) Spider plot del ctDNA dopo 2 cicli di ABVD e alla fine della terapia correlato all'interim PET. (D) Log rank ctDNA (E) Curva PFS stratificata per riduzione del ctDNA

Fonte: Spina, V. et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. Blood (2018). doi:10.1182/blood-2017-11-812073

Allo stesso modo, Camus et al. hanno mostrato un contributo positivo per valutare la recidiva del tumore dopo la chemioterapia convenzionale. In breve, è stata identificata una diminuzione consistente dei livelli di cfDNA (-78,8%) in 45 pazienti sottoposti a regimi di chemioterapia (83,0%). (25) Infine, il sistema CAPP-Seq ha permesso di distinguere pattern molecolari rappresentativi della stadiazione e dell'evoluzione del tumore, suggerendo che il sistema NGS ultra-profondo può rappresentare una strategia soldato per

studiare i campioni di biopsia liquida in diversi contesti clinici. Alla luce di questi risultati, altri studi hanno chiarito il ruolo del flusso di lavoro integrato CAPP-Seq per l'analisi della biopsia liquida nel monitoraggio della malattia residua⁸¹. Questi studi si sono concentrati sul confronto tra la tomografia a emissione di positroni (PET) con 2-deossi-2[F-18] fluoro-D-glucosio e l'analisi molecolare su campioni di biopsia liquida per selezionare i pazienti da somministrare in base al rischio di recidiva^{81,82}. È interessante notare che, rispetto alla PET/TC, è stato rilevato un valore predittivo positivo e negativo del 50,0% e del 70,0%⁸³.

2 SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di tale progetto, è il disegno e la validazione di un pannello genico *customizzato* che sfrutti i punti di forza della piattaforma di sequenziamento genico di nuova generazione (NGS) Ion Torrent™ S5 plus (Thermofisher Scientifics) per l'analisi delle alterazioni molecolari a carico del ctDNA nel monitoraggio della performance clinica nei pazienti affetti da LH sottoposti a trattamento chemioterapico convenzionale. Parallelamente, si valuterà l'accuratezza del ctDNA nella predizione dei pazienti refrattari al trattamento terapeutico. Verrà, inoltre, analizzato il potere diagnostico del ctDNA alla presentazione di malattia e il potere prognostico nel monitoraggio del paziente sottoposto allo *standard of care* di trattamento attraverso la caratterizzazione di meccanismi molecolari di resistenza al trattamento.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Protocollo: fase di validazione

Una coorte di n= 8 pazienti affetti da LH verranno selezionati. Per ciascun paziente, un prelievo di sangue venoso (10 ml) verrà realizzato in Vacutainer™ tappo lilla. I campioni verranno immediatamente inviati laboratorio di Citopatologia dell'Università Federico II di Napoli dove verranno sottoposti ad un protocollo di plasmatura per la separazione del plasma (che conterrà il ctDNA) dagli elementi corpuscolati⁸⁵. Il plasma raccolto verrà

utilizzato per l'estrazione e la purificazione del ctDNA oppure verrà conservato a -80°C fino al processamento. L'estrazione del ctDNA verrà realizzata attraverso protocollo manuale seguendo le specifiche del kit QiAmp Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). L'analisi delle alterazioni molecolari a carico del ctDNA verrà eseguita attraverso l'utilizzo di un pannello genico custom (*Lymphome Custom Panel*) disegnato e sviluppato per l'analisi di spot mutazionali in geni coinvolti nella patogenesi del LH su piattaforma di NGS Ion Torrent™ S5 plus (ThermoFisher Scientific) (77-81).

La procedura analitica prevederà l'utilizzo di un preparatore automatico di librerie (Ion Chef System, ThermoFisher Scientific) che consentirà la produzione di n=8 librerie in ogni seduta analitica attraverso Ion AmpliSeq™ Kit for Chef DL8 (ThermoFisher Scientific). Il pool di librerie generate verrà opportunamente diluito a 60 pM prima di procedere alla produzione del template attraverso Ion 550™ Kit-Chef (ThermoFisher Scientific) su piattaforma automatizzata. La fase di sequenziamento verrà realizzata su Ion 550™ Chip (ThermoFisher Scientific) caricato sulla piattaforma Ion S5™ Plus (ThermoFisher Scientific), I dati saranno analizzati attraverso Ion Reporter Torrent Suite version 5.18.0.1 con un workflow di analisi dedicato. Nel dettaglio, verranno prese in considerazione unicamente le varianti con una profondità di copertura (*coverage*) >500X e un quality score ≥30. I BAM files saranno poi ispezionati visivamente con il Golden Helix Genome Browser v.2.0.7 (Bozeman, MT, USA). Le mutazioni saranno classificate in patogenetiche (P), di incerto significato (VUS) o non patogenetiche (NP) secondo le raccomandazioni dell'American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) usando i database dell'Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA) and ClinVar (NCBI).

3.2 Procedure operative: fase di validazione

Il disegno e lo sviluppo del pannello *Lymphome Custom Panel* sarà realizzato attraverso Ion AmpliSeq Designer torrent suite (ThermoFisher Scientific). L'ottimizzazione della fase di disegno vedrà la creazione di un pannello a 3 pool di primers per consentire la copertura di tutti gli hotspot mutazionali aventi rilevanza clinica nel LH. Il Lymphopanel è stato disegnato per coprire esoni codificanti e siti di splicing che sono spesso mutati in malattie linfoproliferative a linfociti B maturi, scelti nel seguente modo: geni ricorrentemente mutati in più del 5% delle malattie linfoproliferative a linfociti B maturi,

geni riconosciuti come correlati al tumore (anche se mutati in 1-5% dei casi), geni riconosciuti come associati a resistenza a chemioterapia nei linfomi B maturi.

Per ridurre i passaggi analitici e consentire una migliore gestione del pannello sulle piattaforme automatizzate ai fini di un'eventuale introduzione in pratica clinica, si procederà a effettuare delle prove di mixing dei pool di primers per ottenere un pannello costituito unicamente da due pool di primers. Per effettuare la fase di validazione basata sul mixing dei 3 pool, si effettueranno n=3 prove sperimentali in modo da valutare l'adeguatezza di copertura dei target miscelando i 3 pool nel seguente schema:

- 1 prova (panel 1 e panel^{M2A}+ panel^{M2B})
- 2 prova (panel^{M1}+ panel^{M2A} e panel 2B)
- 3 prova (panel^{M1}+ panel^{M2B} e panel 2A)

1 prova: in questo scenario verrà miscelata un'aliquota del pannello 2A e 2B. Essendo i pool di primers in concentrazione equimolare, verrà effettuata una diluizione 1:1 per ottenere il pannello 1 e un nuovo pannello (2A+2B) da utilizzare nelle fasi successive di analisi.

2 prova: in questo scenario verrà miscelata un'aliquota del pannello 1 e 2A. Essendo i pool di primers in concentrazione equimolare, verrà effettuata una diluizione 1:1 per ottenere il pannello 2B e un nuovo pannello (1+2A) da utilizzare nelle fasi successive di analisi.

3 prova: in questo scenario verrà miscelata un'aliquota del pannello 1 e 2B. Essendo i pool di primers in concentrazione equimolare, verrà effettuata una diluizione 1:1 per ottenere il pannello 2A e un nuovo pannello (1+2B) da utilizzare nelle fasi successive di analisi.

4.RISULTATI

4.1 Il disegno del pannello: geni coperti e reference range

Il *Lymphome Custom Panel* copre geni che, se alterati, possono rappresentare un valido ausilio clinico diagnostico per la stratificazione dei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin

variante classica (LHc). Il Lymphome custom panel è stato disegnato per coprire esoni codificanti e siti di splicing di 52 geni che sono spesso mutati in malattie linfoproliferative a linfociti B maturi, il reference range completo del Lymphoma panel customizzato è riportato nei dati supplementari. Il design dell'amplicone (disponibile su richiesta) che copre 228.50 kb di DNA genomico è stato ottimizzato per l'analisi simultanea di 16 campioni con il chip 316v2. (Thermofisher, Foster City, CA, USA) on a Personal Genome Machine Torrent (Thermofisher).

4.2 Risultati metodologici dell'analisi dei campioni di plasma

L'analisi effettuata su campioni ctDNA di pazienti (n=8) affetti da linfoma di Hodgkin variante classica (LHc) mediante piattaforma NGS Iont Torrent™ S5 plus (ThermoFisher Scientific) con l'utilizzo del pannello Lymphome Custom Panel realizzato ha generato un risultato interpretabile in tutti i casi (100%) (Tabella 10). Dal punto di vista metodologico abbiamo ottenuto i seguenti risultati: media delle mapped read era di 24642 (intervallo compreso tra 8407 e 55238), con una percentuale del 74.29% (da 56.56 a 93.18%) di regioni mappate. Per quanto riguarda il coverage, ogni amplicone mostrava una media di copertura di 5490 (intervallo compreso tra 1118 e 8272) ed un'uniformità di distribuzione degli ampliconi del 56.23% (da 24.68% a 82.82%). I geni in questione dove abbiamo riscontrato almeno un'alterazione molecolare sono ARID1A, ATM, BCOR, BCL2, BIRC3, BCL7A, BTG1, BTK, CARD11, CIITA, CREBBP, EP300, EXH2, IRF4, ITPKB, IKBKB, MYC, PAX5, PRDM1, SPEN, STAT6, TET2, TNFAIP3, TP53, KMT2D, XPO1, ZNF217.

Nello specifico, le alterazioni a carico dei geni sopra menzionati sono stati filtrati attraverso un cut off della mutant allele frequency (MAF) del 1.0%. Inoltre, sono state trovate alterazioni definite patogene in tutti i campioni analizzati secondo il database ClinVar (NCBI).

In particolare, per il paziente #ID 01_861 (n=1/8) sono state riscontrate variazioni a carico di un singolo nucleotide (SNV) nei geni SPEN, XPO1, EZH2, ATM, KMT2D, STAT6, BCL7A, CREBBP e TP53, e inserzioni/delezioni (INDEL) a carico dei geni ARID1A, PRMD1 e MYC. Per i geni ARID1A, EZH2, PRMD1, CREBBP e TP53 si osserva una perdita di funzione e per il gene STAT6 un acquisto di funzione. Tuttavia, dal database CLINVAR, due alterazioni sono state identificate come patogene nel gene EZH2 con

una variazione nucleotidica c.1936T>A ed amminoacidica p.Tyr646Asn e frequenza allelica 2.50% e nel gene CREBBP con un cambio nucleotidico di c.4337G>A ed amminoacidico p.Arg1446His e frequenza allelica 9.55%. Solamente l'indel riscontrata nel gene ARID1A con variazione nucleotidica c.3999_4001delGCA (p.Gln1334del) e frequenza allelica 4.88%, è stata identificata come benigna dal database ClinVar (NCBI).

Per il paziente #ID 781_3 (n=2/8) sono state riscontrate variazioni a carico di un singolo nucleotide (SNV) nei geni SPEN, CARD11, KMT2D, STAT6 e BCL7A e inserzioni/delezioni (INDEL) a carico dei geni ARID1A, PRDM1, TNFAIP3 e KMT2D. Per i geni ARID1A, PRDM1 e TNFAIP3 si osserva una perdita di funzione. Tuttavia, dal database CLINVAR, solo l'indel nel gene ARID1A con relativa variazione nucleotidica c.3999_4001delGCA (p.Gln1334del) frequenza allelica del 3.04% è stata identificata come benigna.

Per il paziente #ID 03_788_3 (n=3/8) sono state riscontrate variazioni a carico di un singolo nucleotide (SNV) nei geni SPEN, ITPKB, KMT2D, BTG1, BCL7A, TP53, ZNF217 e BCOR e inserzioni/delezioni (INDEL) a carico dei geni SPEN, TNFAIP3 e KMT2D. Per i geni SPEN, ARID1A, TNFAIP3 e TP53 si osserva una perdita di funzione. Tuttavia, dal database ClinVar (NCBI), una singola alterazione è stata identificata come patogenica nel gene TP53 con cambiamento nucleotidico c.797G>A ed amminoacidico p.Gly266Glu e frequenza allelica 3.45%. Inoltre, solo l'indel nel gene ARID1A con relativa variazione nucleotidica c.3999_4001delGCA (p.Gln1334del) e frequenza allelica del 3.24% è stata identificata come benigna.

Per il paziente #ID 805_01 (n=4/8) sono state riscontrate variazioni a carico di un singolo nucleotide (SNV) nei geni SPEN, ITPKB, TET2, MYC, PAX5, KMT2D, BCL7A e TP53 e inserzioni/delezioni (INDEL) a carico dei geni ARID1A, PRDM1. Per i geni ARID1A, PRDM1 e TP53 si osserva una perdita di funzione. Dal database CLINVAR, l'indel nel gene ARID1A con relativa variazione nucleotidica c.3999_4001delGCA (p.Gln1334del) e frequenza allelica del 3.24% è stata identificata come benigna.

Per il paziente #ID 819_01 (n=5/8) sono state riscontrate variazioni a carico di un singolo nucleotide (SNV) nei geni SPEN, XPO1, KMT2D, BCL7A, CIITA e ZNF217 e inserzioni/delezioni (INDEL) a carico dei geni SPEN e ARID1A. L'indel riscontrata nel gene ARID1A è stata c.3999_4001delGCA (p.Gln1334del) con frequenza allelica 2.78% e dal database di riferimento è stata identificata come benigna.

Per il paziente #ID 001_L (n=6/8) sono state riscontrate variazioni a carico di un singolo nucleotide (SNV) nei geni *SPEN*, *TET2*, *TNFAIP3*, *CARD11*, *IKBKB*, *BIRC3*, *ATM*, *KMT2D*, *BCL7A* e *CREBBP* e inserzioni/delezioni (INDEL) a carico dei geni *SPEN*, *ARID1A* e *PRDM1*. Nei geni *SPEN*, *ARID1A* e *PRDM1* si assiste ad una perdita di funzione. L'indel riscontrata nel gene *ARID1A*, riconosciuta come benigna, è stata c.3999_4001delGCA (p.Gln1334del) con frequenza allelica 3.18%.

Per il paziente #ID G.LLO (n=7/8) sono state riscontrate variazioni a carico di un singolo nucleotide (SNV) nei geni *SPEN*, *IRF4*, *H3C2*, *ATM*, *KMT2D*, *BCL7A*, *CIITA*, *EP300*, *BCOR* e *BTK* e inserzioni/delezioni (INDEL) a carico dei geni *KMT2D*. Per il gene *KMT2D* si assiste ad una perdita di funzione. Tuttavia le variazioni rilevate non sono state identificate né come benigne né come patogeniche dal database ClinVar (NCBI).

Per il paziente #ID Gin_005 (n=8/8) sono state riscontrate variazioni a carico di un singolo nucleotide (SNV) nei geni *SPEN*, *ATM*, *KMT2D*, *BCL7A* e inserzioni/delezioni (INDEL) a carico dei geni *ARID1A*, *TNFAIP3* e *MYC*. Nei geni *SPEN*, *ARID1A*, *TNFAIP3* e *ATM* si assiste ad una perdita di funzione, invece nel gene *MYC* ad un acquisto di funzione. Dal database ClinVar (NCBI), una singola alterazione è stata identificata come patogena nel gene *ATM* con sostituzione nucleotidica c.6004C>T ed amminoacidica p.Gln2002Ter e frequenza allelica 40.07%

Le altre varianti presenti nei restanti geni nei pazienti analizzati n=8 ricoperti dal pannello Lymphome Custom Panel sono state classificate come unknown nel database ClinVar (NCBI) ad oggi disponibile.

Table 10. Risultati mutazionali del ctDNA degli 8 campioni analizzati

ID	Locus	Ref	Observed Allele	Type	Genes	Location	Length	Onconome / Onconime + Info	Allele Freq	Amino Acid	Read Count	Coverage	
01_861	chr1:16264024	C	SNV	SPEN	SPEN.exonic.NM_015001.3	1	13.30	p.Pro3465Thr	2000				
01_861	chr1:12700175	ACCCCTCCGAGCAGCAGCAGCAGCAGCA	INDEL	ARID1A	ARID1A.exonic.NM_006015.6	3	Hotspot	Loss-of-Function	ACCCCTCCCC	p.Gln1334del	194		
01_861	chr7:22017946	C	SNV	XPO1	XPO1.splice.site.NM_003040.4	1	2.36	p.T	595				
01_861	chr6:10655020	GCGGCCG	INDEL	PRDM1	PRDM1.exonic.NM_011988.4	1	Truncating	Loss-of-Function	CGGGCCAA	p.C7pT14GlnfsTer10	1		
01_861	chr7:14850728	A	SNV	EZH2	EZH2.exonic.NM_004455.5	1	Hotspot	Loss-of-Function	2.50	p.Arg646An	2000		
01_861	chr8:128750604	CCAGCAGCAGCAGCA	INDEL	MVC	MVC.exonic.NM_002467.6	3	Hotspot	Gain-of-Function	CCAGCAGCA	p.Gln52del	1945		
01_861	chr11:108188236	G	SNV	ATM	ATM.exonic.NM_000051.4	1	2.61	p.Cys2112Yr	1105				
01_861	chr12:49436012	T	SNV	KMT2D	KMT2D.exonic.NM_003482.4	1	3.36	p.Glu1590Gly	139				
01_861	chr12:49446021	G	SNV	KMT2D	KMT2D.exonic.NM_003482.4	1	0.86	p.Asp462Glu	361				
01_861	chr12:49446064	G	SNV	KMT2D	KMT2D.exonic.NM_003482.4	1	3.23	p.Ser468Pro	1983				
01_861	chr12:5749661	T	SNV	STAT6	STAT6.exonic.NM_003153.5	1	Hotspot	Gain-of-Function	4.70	p.Asp419Gly	2000		
01_861	chr12:122481828	C	SNV	BCL7A	BCL7A.exonic.NM_020993.5	1	6.24	p.Ser103Phe	1987				
01_861	chr16:37788617	C	SNV	CREBBP	CREBBP.exonic.NM_004380.3	1	Hotspot	Loss-of-Function	9.55	p.Arg1446His	1309		
01_861	chr17:5777108	C	SNV	TP53	TP53.exonic.NM_000546.6	1	Hotspot	Loss-of-Function	1.59	p.Pro277Phe	2000		
781_3	chr1:16264024	C	SNV	SPEN	SPEN.exonic.NM_015001.3	1	12.32	p.Pro3465Thr	1996				
781_3	chr6:10655019	GCGGCCG	INDEL	ARID1A	ARID1A.exonic.NM_006015.6	3	Hotspot	Loss-of-Function	ACCCCTCCCC	p.Pro714GlnfsTer10	1975		
781_3	chr6:138202138	CGGGGT	CGGGCCA,GGGCCA,GCGGCCG	INDEL	TNFAIP3	TNFAIP3.exonic.NM_00270507.2	1	Truncating	Loss-of-Function	CGGGGGTA	p.Glu751ArgfsTer18	1998	
781_3	chr7:29378708	A	SNV	CARD11	CARD11.exonic.NM_032415.7	1	2.42	p.Arg215Gly	301				
781_3	chr12:49426769	GCAGCT	INDEL	KMT2D	KMT2D.exonic.NM_003482.4	1	GCA>2,30,	p.Gln390Sdel	1956				
781_3	chr12:49444517	A	SNV	KMT2D	KMT2D.exonic.NM_003482.4	1	2.40	p.Ser952Pro	2000				
781_3	chr12:4946021	G	SNV	KMT2D	KMT2D.exonic.NM_003482.4	1	9.18	p.Alal82Glu	523				
781_3	chr12:57493870	T	SNV	STAT6	STAT6.exonic.NM_003153.5	1	2.20	p.Ile452Leu	1309				
781_3	chr12:122481828	C	SNV	BCL7A	BCL7A.exonic.NM_020993.5	1	7.39	p.Ser103Phe	1989				
788_3	chr1:16255141	GGA	INDEL	SPEN	SPEN.exonic.NM_015001.3	2	Truncating	Loss-of-Function	2.35	p.Arg806ThrsTer14	1957		
788_3	chr1:16264024	C	SNV	SPEN	SPEN.exonic.NM_015001.3	1	12.95	p.Pro3465Thr	2000				
788_3	chr1:27100175	ACCCCTCCGAGCAGCAGCAGCAGCAGCA	INDEL	ARID1A	ARID1A.exonic.NM_006015.6	3	Hotspot	Loss-of-Function	ACCCCTCCCC	p.Gln1334del	1946		
788_3	chr1:22691426	G	SNV	ITPKB	ITPKB.exonic.NM_002221.3	1	Truncating	Unclassified	2.55	p.Cys178Ter	1999		
788_3	chr6:138192546	GCGAGATCATCCAAAGSCCTCA	INDEL	TNFAIP3	TNFAIP3.exonic.NM_00270507.2	23	Truncating	Loss-of-Function	ACCCCTCCCC	p.Pro714GlnfsTer1	1994		
788_3	chr12:49426769	GCAGCT	INDEL	KMT2D	KMT2D.exonic.NM_003482.4	3	GCA>2,46,	p.Gln390Sdel	1956				
788_3	chr12:4946021	G	SNV	KMT2D	KMT2D.exonic.NM_003482.4	1	6.83	p.Alal82Glu	684				
788_3	chr12:4946064	A	G	SNV	KMT2D	KMT2D.exonic.NM_003482.4	1	2.37	p.Ser468Pro	1983			
788_3	chr12:92539221	G	SNV	BTGLLOC	BTGLLOC.exonic.NM_001731.3, LOC1019286	1	2.						

5. DISCUSSIONE

Lo studio stabilisce che il ctDNA è la fonte del DNA tumorale per la profilazione mutazionale del LH. Superando i principali ostacoli tecnici che hanno finora limitato la genotipizzazione di LH, il nostro approccio tecnico basato sul ctDNA ha permesso una valutazione su larga scala delle mutazioni di tale patologia a diagnosi.

La procedura di sequenziamento qui riportata presenta diversi vantaggi, infatti, utilizzando un singolo pannello, siamo stati in grado di rilevare fino a 99 mutazioni in 27 geni (ARID1A, ATM, BCOR, BCL2, BIRC3, BLC7A, BTG1, BTK, CARD11, CIITA, CREBBP, EP300, EXH2, IRF4, ITPKB, IKBKB, MYC, PAX5, PRDM1, SPEN, STAT6, TET2, TNFAIP3, TP53, KMT2D, XPO1, ZNF217). Mutazioni non somatiche sono state individuate nel ctDNA di tutti gli 8 pazienti analizzati, includendo varianti di TNFAIP3, ITPKB, CARD11, and CIITA genes, già riportati in diversi studi su cellule purificate di HRS. In accordo alla letteratura, abbiamo osservato ricorrenti acquisti di funzione in una regione del cromosoma 2 contenente *MYC* e acquisti di funzione per *STAT6*; sono stati osservati soprattutto perdite di funzione in segmenti genici coinvolgenti *PRDM1* e *TNFAIP3* e *KMTD2*.

I protocolli, i pannelli e le *variant caller* di PGM Ion Torrent non detectano mutazioni poco abbondanti e diluite in una grande quantità di DNA wild type. Pertanto, abbiamo utilizzato diverse strategie interne specificamente adattate al cfDNA. In primo luogo, abbiamo ridotto il numero di geni ed esoni rispetto ai test disponibili in commercio, e abbiamo modificato le soglie per la chiamata delle varianti, in particolare tutte le varianti con Copertura allelica >5X e uno score di qualità >20, all'interno di un amplicone che coprivano almeno 1000X alleli, sono stati chiamati.

6. CONCLUSIONE

In questo studio dimostriamo che le prestazioni del sequenziamento ultra-profondo utilizzando un pannello NGS su Ion Torrent PGM è eccellente, e che questa procedura può essere utilizzata per l'analisi di routine delle mutazioni tumorali rilevanti nel cfDNA.

L'NGS di per sé è una procedura efficace in termini di tempo per analizzare un gran numero di campioni, ottimizzando così il flusso di lavoro nei laboratori di patologia molecolare. Con la nostra procedura è possibile processare contemporaneamente diversi tipi di campioni (DNA da tessuti tumorali e cfDNA da fluidi biologici).

Oltre ad essere un'alternativa alla diagnosi molecolare a livello presentazione quando il tessuto tumorale non è disponibile, la biopsia liquida è anche un test non invasivo con cui monitorare la risposta terapia mirata e per rilevare l'insorgenza di resistenze mutazioni. Il monitoraggio consisterebbe nel quantificare le frazioni alleliche mutanti nel cfDNA nel corso del tempo, che possono essere valutati in modo affidabile dal nostro test NGS.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Bray, F., Ren, J. S., Masuyer, E. & Ferlay, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int. J. Cancer* (2013). doi:10.1002/ijc.27711
2. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* (2013). doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027
3. AIRTUM Working Group, CCM & AIEOP Working Group. Italian cancer figures, report 2012: Cancer in children and adolescents. *Epidemiol. Prev.* (2013).
4. Levine, P. H. *et al.* Evaluation of epstein-barr virus antibody patterns and detection of viral markers in the biopsies of patients with Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* (1994). doi:10.1002/ijc.2910590111
5. Thomas, R. K., Re, D., Zander, T., Wolf, J. & Diehl, V. Epidemiology and etiology of Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* (2002). doi:10.1093/annonc/mdf652
6. Haim, N., Cohen, Y. & Robinson, E. Malignant Lymphoma in First-Degree Blood Relatives. *Cancer* (1982). doi:10.1002/1097-0142(19820515)49:10<2197::AID-CNCR2820491036>3.0.CO;2-9
7. Ozhand, A. *et al.* Heritability of Hematologic Neoplasms in Twins: An Update. *Blood* (2012). doi:10.1182/blood.v120.21.3636.3636
8. Carbone, A., Gloghini, A., Serraino, D. & Spina, M. HIV-associated Hodgkin lymphoma. *Current Opinion in HIV and AIDS* (2009). doi:10.1097/COH.0b013e32831a722b
9. Agostinelli, C. & Pileri, S. Pathobiology of Hodgkin Lymphoma. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* (2014). doi:10.4084/MJHID.2014.040
10. Von Wasielewski, R. *et al.* Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood* (2000). doi:10.1182/blood.v95.4.1207.004k34_1207_1213
11. Ott, G., Hsi, E. D., Delabie, J. & Rodig, S. Principles of the pathology and biology of malignant lymphomas. in *Rare Lymphomas* (2014). doi:10.1007/978-

3-642-39590-1_1

12. Campo, E. *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: Evolving concepts and practical applications. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2011-01-293050
13. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* (2016). doi:10.1182/blood-2016-01-643569
14. Carbone, A. & Gloghini, A. Hodgkin lymphoma classification: Are we at a crossroads? *Cancer* (2017). doi:10.1002/cncr.30824
15. Marr, K. a, Laverdiere, M., Gugel, A. & Leisenring, W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1762–9 (2005).
16. Marafioti, T. *et al.* Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription. *Blood* (2000). doi:10.1182/blood.v95.4.1443.004k55_1443_1450
17. Kolar, Z. *et al.* Apoptosis of malignant cells in Hodgkin's disease is related to expression of the cdk inhibitor p27KIP1. *J. Pathol.* (2000). doi:10.1002/(SICI)1096-9896(200004)190:5<604::AID-PATH561>3.0.CO;2-P
18. Browne, P., Petrosyan, K., Hernandez, A. & Chan, J. A. The B-Cell Transcription Factors BSAP, Oct-2, and BOB.1 and the Pan-B-Cell Markers CD20, CD22, and CD79a Are Useful in the Differential Diagnosis of Classic Hodgkin Lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* (2003). doi:10.1309/YCH8DWUFFQBKG PVB
19. Vardhana, S. & Younes, A. The immune microenvironment in hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica* (2016). doi:10.3324/haematol.2015.132761
20. Vaklavas, C. & Forero-Torres, A. Safety and efficacy of brentuximab vedotin in patients with Hodgkin lymphoma or systemic anaplastic large cell lymphoma. *Ther. Adv. Hematol.* (2012). doi:10.1177/2040620712443076
21. Visco, C. *et al.* Very high levels of soluble CD30 recognize the patients with classical Hodgkin's lymphoma retaining a very poor prognosis. *Eur. J. Haematol.* (2006). doi:10.1111/j.1600-0609.2006.00725.x
22. Merryman, R. W., Armand, P., Wright, K. T. & Rodig, S. J. Checkpoint blockade

- in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *Blood Adv.* (2017).
doi:10.1182/bloodadvances.2017012534
23. Küppers, R. Genomic Analysis of Hodgkin Lymphoma. *Blood* (2019).
doi:10.1182/blood-2019-121073
24. Tiacci, E. *et al.* Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* (2018). doi:10.1182/blood-2017-11-814913.
25. Spina, V. *et al.* Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* (2018).
doi:10.1182/blood-2017-11-812073
26. Hopper, K. D., Diehl, L. F., Lynch, J. C. & McCauslin, M. A. Mediastinal bulk in hodgekin disease: Method of measurement versus prognosis. *Invest. Radiol.* (1991). doi:10.1097/00004424-199112000-00015
27. Vassilakopoulos, T. P. *et al.* Development and validation of a clinical prediction rule for bone marrow involvement in patients with Hodgkin lymphoma. *Blood* (2005). doi:10.1182/blood-2004-01-0379
28. Boikov, I. V., Trufanov, G. Y. & Ipatov, V. V. Determination of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma stage with combined positron-emission and computed tomography. *Bull. Sib. Med.* (2011). doi:10.20538/1682-0363-2011-6-100-108
29. Josting, A. *et al.* New Prognostic Score Based on Treatment Outcome of Patients With Relapsed Hodgkin's Lymphoma Registered in the Database of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J. Clin. Oncol.* (2002).
doi:10.1200/jco.2002.20.1.221
30. Cosset, J. M. *et al.* The EORTC trials for limited stage Hodgkin's disease. *Eur. J. Cancer* (1992). doi:10.1016/0959-8049(92)90018-W
31. Hasenclever, D. & Diehl, V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* (1998). doi:10.1056/NEJM199811193392104
32. Meignan, M., Gallamini, A. & Haioun, C. Report on the First International Workshop on interim-PET scan in lymphoma. in *Leukemia and Lymphoma* (2009). doi:10.1080/10428190903040048
33. Eichenauer, D. A. *et al.* Hodgkin lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* (2018).
doi:10.1093/annonc/mdy080
34. Zinzani, P. L. *et al.* Early interim 18F-FDG PET in Hodgkin's lymphoma: Evaluation on 304 patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* (2012).

doi:10.1007/s00259-011-1916-8

35. Gallamini, A. & Kostakoglu, L. Interim FDG-PET in Hodgkin lymphoma: A compass for a safe navigation in clinical trials? *Blood* (2012). doi:10.1182/blood-2012-03-403790
36. Hutchings, M. & Barrington, S. F. PET/CT for therapy response assessment in lymphoma. *Journal of Nuclear Medicine* (2009). doi:10.2967/jnumed.108.057190
37. Cerci, J. J. *et al.* Cost effectiveness of positron emission tomography in patients with Hodgkin's lymphoma in unconfirmed complete remission or partial remission after first-line therapy. *J. Clin. Oncol.* (2010). doi:10.1200/JCO.2009.25.4367
38. Sucak, G. T. *et al.* Early post-transplantation positron emission tomography in patients with Hodgkin lymphoma is an independent prognostic factor with an impact on overall survival. *Ann. Hematol.* (2011). doi:10.1007/s00277-011-1209-0
39. Terasawa, T., Dahabreh, I. J. & Nihashi, T. Fluorine-18-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography in Response Assessment Before High-Dose Chemotherapy for Lymphoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncologist* (2010). doi:10.1634/theoncologist.2010-0054
40. Svoboda, J. *et al.* Prognostic value of FDG-PET scan imaging in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* (2006). doi:10.1038/sj.bmt.1705416
41. Kostakoglu, L. & Goldsmith, S. J. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the staging and follow-up of lymphoma: Is it time to shift gears? *European Journal of Nuclear Medicine* (2000). doi:10.1007/s002590000340
42. Moghbel MC, Mittra E, Gallamini A, *et al.* Response assessment criteria and their applications in lymphoma: part 2. *J Nucl Med.* 2017;58(1):13-22.]
43. Moghbel MC, Mittra E, Gallamini A, *et al.* Response assessment criteria and their applications in lymphoma: part 2. *J Nucl Med.* 2017;58(1):13-22.]
44. Bonadonna, G. *et al.* ABVD plus subtotal nodal versus involved-field radiotherapy in early-stage Hodgkin's disease: Long-term results. *J. Clin. Oncol.* (2004). doi:10.1200/JCO.2004.12.170
45. Franklin, J., Eichenauer, D. A., Becker, I., Monsef, I. & Engert, A. Optimisation

- of chemotherapy and radiotherapy for untreated Hodgkin lymphoma patients with respect to second malignant neoplasms, overall and progression-free survival: Individual participant data analysis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2017). doi:10.1002/14651858.CD008814.pub2
46. Engert, A. *et al.* Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* (2010). doi:10.1056/NEJMoa1000067
 47. Brusamolino, E. *et al.* Classical Hodgkin's lymphoma in adults: guidelines of the Italian Society of hematology, the Italian Society of Experimental hematology, and the Italian Group for Bone Marrow Transplantation on initial work-up, management, and follow-up. *Haematologica* (2009). doi:10.3324/haematol.2008.002451
 48. Engert, A. & Raemaekers, J. Treatment of early-stage Hodgkin lymphoma. *Seminars in Hematology* (2016). doi:10.1053/j.seminhematol.2016.05.004
 49. Raemaekers, J. M. M. *et al.* Omitting Radiotherapy in early positron emission tomography-negative stage I/II Hodgkin lymphoma is associated with an increased risk of early relapse: Clinical results of the preplanned interim analysis of the randomized EORTC/LYSA/FIL H10 trial. *J. Clin. Oncol.* (2014). doi:10.1200/JCO.2013.51.9298
 50. Hoppe, R. T. *et al.* Hodgkin Lymphoma, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* (2020). doi:10.6004/jnccn.2020.0026
 51. Engert, A. *et al.* Escalated-dose BEACOPP in the treatment of patients with advanced-stage Hodgkin's lymphoma: 10 Years of follow-up of the GHSG HD9 study. *J. Clin. Oncol.* (2009). doi:10.1200/JCO.2008.19.8820
 52. Borchmann, P. *et al.* Eight cycles of escalated-dose BEACOPP compared with four cycles of escalated-dose BEACOPP followed by four cycles of baseline-dose BEACOPP with or without radiotherapy in patients with advanced-stage hodgkin's lymphoma: Final analysis of the HD12 trial o. *J. Clin. Oncol.* (2011). doi:10.1200/JCO.2010.33.9549
 53. Gallamini, A. *et al.* Early chemotherapy intensification with escalated beacopp in patients with advanced-stage hodgkin lymphoma with a positive interim positron emission tomography/computed tomography scan after two abvd cycles: Long-term results of the GITIL/FIL HD 0607 tria. *J. Clin. Oncol.* (2018). doi:10.1200/JCO.2017.75.2543

54. Picardi M, Giordano C, Pugliese N, Esposito M, Fatigati M, Muriano F, Rascato MG, Della Pepa R, D'Ambrosio A, Vigliar E, Troncone G, Russo D, Mascolo M, Esposito G, Prastaro M, Esposito R, Tocchetti CG, Fonti R, Mainolfi C, Del Vecchio S, Pane F. Liposomal doxorubicin supercharge-containing front-line treatment in patients with advanced-stage diffuse large B-cell lymphoma or classical Hodgkin lymphoma: Preliminary results of a single-centre phase II study. *Br J Haematol*. 2022 Sep;198(5):847-860. doi: 10.1111/bjh.18348. Epub 2022 Jul 12. PMID: 35819919; PMCID: PMC9541306.
55. Moccia AA, Donaldson J, Chhanabhai M, Hoskins PJ, Klasa RJ, Savage KJ, Shenkier TN, Slack GW, Skinnider B, Gascoyne RD, Connors JM, Sehn LH. International Prognostic Score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: altered utility in the modern era. *J Clin Oncol*. 2012 Sep 20;30(27):3383-8. doi: 10.1200/JCO.2011.41.0910. Epub 2012 Aug 6. PMID: 22869887].
56. [Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müeller SP, et al. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 20;32(27):3048-58. doi: 10.1200/JCO.2013.53.5229. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2016 Jul 20;34(21):2562. PMID: 25113771.21,22].
57. Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, Aboyans V, Asteggiano R, Galderisi M, et al. ESC Scientific Document Group. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2016 Sep 21;37(36):2768-2801. doi: 10.1093/eurheartj/ehw211. Epub 2016 Aug 26. Erratum in: *Eur Heart J*. 2016 Dec 24; PMID: 27567406.
58. Moskowitz CH, Schöder H, Teruya-Feldstein J, Sima C, Iasonos A, Portlock CS, et al. Risk-adapted dose-dense immunochemotherapy determined by interim FDG-PET in Advanced-stage diffuse large B-Cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 10;28(11):1896-903. doi: 10.1200/JCO.2009.26.5942. Epub 2010 Mar 8. PMID: 20212248; PMCID: PMC3651601.
59. Zinzani PL, Broccoli A, Gioia DM, Castagnoli A, Ciccone G, Evangelista A, et al. Interim Positron Emission Tomography Response-Adapted Therapy in Advanced-Stage Hodgkin Lymphoma: Final Results of the Phase II Part of the

- HD0801 Study. *J Clin Oncol*. 2016 Apr 20;34(12):1376-85. doi: 10.1200/JCO.2015.63.0699. Epub 2016 Feb 16. PMID: 26884559.
60. Nakayama H., Aisa Y., Ito C., Shimazaki K., Katsumata Y., Hayashi H. et al. Importance of histologic verification of positive positron emission tomography/computed tomography findings in the follow-up of patients with malignant lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2015; 15: 753-76010].
 61. Picardi M, Fonti R, Della Pepa R, Giordano C, Pugliese N, Nicolai E, Salvatore M, Mainolfi C, Venetucci P, Rascato MG, Cappuccio I, Mascolo M, Vigliar E, Troncone G, Del Vecchio S, Pane F. 2-deoxy-2[F-18] fluoro-D-glucose positron emission tomography Deauville scale and core-needle biopsy to determine successful management after six doxorubicin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine cycles in advanced-stage Hodgkin lymphoma. *Eur J Cancer*. 2020 Jun;132:85-97. doi: 10.1016/j.ejca.2020.03.008. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32334339.
 62. Adams H.J.A., Kwee T.C. Proportion of false-positive lesions at interim and end-of-treatment FDG-PET in lymphoma as determined by histology: systematic review and meta-analysis. *Eur J Radiol*. 2016; 85: 1963-1970.
 63. Küppers R, Klein U, Schwering I, Distler V, Bräuninger A, Cattoretti G, Tu Y, Stolvitzky GA, Califano A, Hansmann ML, Dalla-Favera R. Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest*. 2003;111:529-37
 64. Malec M, Söderqvist M, Sirsjö A, et al. Real-time polymerase chain reaction determination of cytokine mRNA expression profiles in Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2004;89:679-685.
 65. Mata E, Díaz-López A, Martín-Moreno AM, Sánchez-Beato M, Varela I, Mestre MJ, Santonja C, Burgos F, Menárguez J, Estévez M, Provencio M, Sánchez-Espiridión B, Díaz E, Montalbán C, Piris MA, García JF. Analysis of the mutational landscape of classic Hodgkin lymphoma identifies disease heterogeneity and potential therapeutic targets. *Oncotarget*. 2017 ;8:111386-111395.
 66. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, Giulino-Roth L, Tam W, Liu Y, Gaiolla R, Eng K, Brody J, Inghirami G, Carlo-Stella C, Santoro A, Rahal D, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and

- Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2015; 125:1061-1072
67. Mata E, Díaz-López A, Martín-Moreno AM, Sánchez-Beato M, Varela I, Mestre MJ, Santonja C, Burgos F, Menárguez J, Estévez M, Provencio M, Sánchez-Espiridión B, Díaz E, Montalbán C, Piris MA, García JF. Analysis of the mutational landscape of classic Hodgkin lymphoma identifies disease heterogeneity and potential therapeutic targets. *Oncotarget*. 2017 ;8:111386-111395.
 68. Mata E, Fernández S, Astudillo A, et al. Genomic analyses of microdissected Hodgkin and Reed-Sternberg cells: mutations in epigenetic regulators and p53 are frequent in refractory classic Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J*. 2019;9:34.
 69. Malapelle U, Pisapia P, Pepe F, et al. The evolving role of liquid biopsy in lung cancer. *Lung Cancer*. 2022;172:53-64.
 70. Ignatiadis M, Sledge GW, Jeffrey SS. Liquid biopsy enters the clinic—implementation issues and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18:297-312.
 71. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol*. 2015;16:541-549.
 72. Armand P, Oki Y, Neuberg DS, et al. Detection of circulating tumour DNA in patients with aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2013;163:123-126.
 73. Hohaus S, Giachelia M, Massini G, et al. Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann Oncol*. 2009;20:1408-1413
 74. Garcia-Pardo M, Czarnecka K, Law JH, et al. Plasma-first: accelerating lung cancer diagnosis and molecular profiling through liquid biopsy. *Ther Adv Med Oncol*. 2022;14:17588359221126151.
 75. Rossi D, Diop F, Spaccarotella E, et al. Diffuse large B-cell lymphoma genotyping on the liquid biopsy. *Blood*. 2017;129:1947-1957.
 76. Newman AM, Bratman SV, To J, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014;20:548-554.
 77. Spina V, Brusca A, Cuccaro A, et al. Circulating tumor DNA reveals genetics, clonal evolution, and residual disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2018;131:2413-2425.
 78. Righolt CH, Knecht H, Mai S. DNA superresolution structure of reed-sternberg

- cells differs between long-lasting remission versus relapsing Hodgkin's lymphoma patients: DNA structure in pre-treatment Hodgkin's lymphoma. *J Cell Biochem.* 2016;117:1633- 1637. doi:10.1002/jcb.25456.
79. Camus V, Viennot M, Lequesne J, et al. Targeted genotyping of circulating tumor DNA for classical Hodgkin lymphoma monitoring: a prospective study. *Haematologica.* 2021;106:154-162.
 80. Camus V, Jardin F. Cell-free DNA for the management of classical hodgkin lymphoma. *Pharmaceuticals.* 2021;14(3):207. doi:10.3390/ ph14030207
 81. Decazes P, Camus V, Bohers E, et al. Correlations between baseline 18F-FDG PET tumour parameters and circulating DNA in diffuse large B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *EJNMMI Res.* 2020;10(1):120. doi:10.1186/s13550-020-00717-y.
 82. Kurtz DM, Scherer F, Jin MC, et al. Circulating tumor DNA measurements as early outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 2018;36:2845-2853. doi:10.1200/JCO.2018.78.5246.
 83. Maco M, Kupcova K, Herman V, et al. Circulating tumor DNA in Hodgkin lymphoma. *Ann Hematol.* 2022;101(11):2393-2403. doi:10.1007/s00277-022-04949-x.
 84. Malapelle U, Mayo de-Las-Casas C, Rocco D, Garzon M, Pisapia P, Jordana-Ariza N, Russo M, Sgariglia R, De Luca C, Pepe F, Martinez-Bueno A, Morales-Espinosa D, González-Cao M, Karachaliou N, Viteri Ramirez S, Bellevicine C, Molina-Vila MA, Rosell R, Troncone G. Development of a gene panel for next-generation sequencing of clinically relevant mutations in cell-free DNA from cancer patients. *Br J Cancer.* 2017;116:802-810