

Tesi di dottorato in  
MORFOLOGIA CLINICA E PATOLOGICA  
XXII CICLO  
Coordinatore: prof.ssa Stefania Montagnani

**Valutazione immunofenotipica del  
linfoma a grandi cellule B diffuso:  
predizione prognostica e programmazione terapeutica**

Docente guida  
Prof. Pio Zeppa

Candidato  
Dott. Immacolata Cozzolino

## INDICE

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Premessa                          | pag.3  |
| Introduzione                      |        |
| 1. Inquadramento generale         | pag.5  |
| 2. Profilo molecolare             | pag.8  |
| 3. Citologia e tecniche ancillari | pag.10 |
| Scopo progetto di ricerca         | pag.14 |
| Casistica                         | pag.15 |
| Metodi                            | pag.17 |
| Risultati                         | pag.20 |
| Discussione                       | pag.22 |
| Bibliografia                      | pag.27 |

## PREMESSA

I linfomi non Hodgkin (LNH) sono stati nel corso degli ultimi decenni ampiamente studiati non solo dal punto di vista morfologico e fenotipico, ma anche genetico e molecolare. La crescita esponenziale delle conoscenze a nostra disposizione ha consentito lo sviluppo di tecniche ancillari utili nella formulazione di sistemi classificativi incentrati sulle caratteristiche fenotipiche e genotipiche, piuttosto che istologiche. Poiché tali tecniche sono applicabili anche a campioni citologici, la FNC, nonostante in passato sia stata considerata con scetticismo nella diagnosi dei LNH per l'incapacità della tecnica di fornire informazioni riguardanti il loro pattern di crescita istologico, negli ultimi anni è stata sempre più utilizzata nella diagnostica e nella ricerca oncoematologica ed è stata rivalutata come un valido strumento diagnostico nella identificazione di neoplasie linfoidi.

L'immunofenotipizzazione è una delle componenti fondamentali dello schema di classificazione dei LNH e ha permesso l'ulteriore sottotipizzazione di alcuni istotipi, dimostrandosi quindi estremamente utile ai fini diagnostici. Fornire dati riguardanti caratteristiche fenotipiche specifiche della popolazione linfoide del singolo paziente, nelle varie fasi della malattia, per esempio prima e dopo il trattamento, apre incoraggianti prospettive. Offre, inoltre, la possibilità di utilizzare, valutando il pattern di espressione di specifici antigeni, nuovi farmaci diretti contro target molecolari. In questo modo, l'utilizzo di farmaci selettivi in protocolli terapeutici personalizzati, rispetto alla chemioterapia tradizionale che prevede la somministrazione di protocolli prestabiliti a tutti i pazienti, permetterebbe di ridurre gli effetti collaterali e di massimizzare l'efficacia terapeutica. Pertanto, la caratterizzazione fenotipica e, ove possibile, quella molecolare, su campioni citologici, delle popolazioni cellulari neoplastiche potrebbe rappresentare, in futuro, uno degli aspetti fondamentali nella diagnostica dei LNH per

l'importante ruolo contributivo che può offrire nella valutazione prognostica e nella pianificazione terapeutica.

Il linfoma a grandi cellule B diffuso (DLBCL), oggetto del nostro studio, è il più frequente tipo di LNH negli adulti ed è estremamente eterogeneo sia in termini istopatologici e molecolari che per quanto riguarda il comportamento clinico e la risposta terapeutica. In base a tale eterogeneità molti ricercatori considerano questo linfoma come uno spettro di diverse entità e, con il passare degli anni, l'obiettivo di molti è stato quello di identificare sottotipi più aggressivi con una prognosi peggiore che potessero beneficiare di un più intensivo trattamento. Pertanto il DLBCL rappresenta, anche su campione citologico, un modello particolarmente confacente allo studio delle problematiche sopradescritte.

## INTRODUZIONE

### 1. Inquadramento generale

Il DLBCL è il più comune tipo di LNH negli adulti(1). Rappresenta circa il 30-40% di tutti i linfomi diagnosticati ogni anno nei paesi occidentali (1). Sebbene il DLBCL è di solito considerato come una specifica categoria, la notevole diversità in termini di comportamento clinico, aspetti morfologici ed alterazioni genetiche e molecolari rispetto ad altri tipi di linfomi, suggerisce che questi tumori rappresentino un gruppo piuttosto eterogeneo di neoplasie piuttosto che una singola entità clinico-patologica(2,3). Si riconoscono DLBCL primitivi, quando si sviluppano “de novo” e forme secondarie, quando c'è una progressione da un linfoma indolente (leucemia linfatica cronica/linfoma linfocitico a piccole cellule (CLL/SLL), linfoma follicolare (LF), linfoma marginale(LM) ed il linfoma di Hodgkin nodulare a predominanza linfocitaria (NPLHL)) ad una forma più aggressiva(4). Può essere linfonodale o extralinfonodale, Nel 40% dei casi ci può essere al momento della presentazione clinica esclusivamente un coinvolgimento extranodale(4).

E' costituito da cellule B attivate di grossa taglia con pattern di crescita diffuso ed alto indice di proliferazione(4). La popolazione neoplastica tipicamente sovrverte la normale architettura del linfonodo o del tessuto extralinfonodale con un pattern diffuso(4).

Sulla base degli aspetti citologici può essere diviso in diverse varianti. La variante più frequente è quella centroblastica (80% dei casi) dove la popolazione cellulare è composta da cellule che ricordano i centroblasti del centro germinativo; nella variante immunoblastica, che rappresenta il 10% dei DLBCL, il 90% della popolazione neoplastica è costituita per lo più da immunoblasti. Altre varianti morfologiche includono la variante T-cll-

Rich/Histocyte-Rich che presenta un prominente background costituito prevalentemente da linfociti T reattivi e, più raramente, da istiociti, dove le cellule neoplastiche costituiscono poco più del 10% delle cellule neoplastiche. Infine nella variante anaplastica le cellule sono morfologicamente simili a quelle del linfoma T/null ALCL, con nuclei pleomorfi, abbondante citoplasma, pattern di crescita sinusale e positività per CD30(1,4).

Per la maggior parte dei pazienti, l'etiologia del DLBCL è sconosciuta; si ritiene che diversi fattori possano potenzialmente aumentare il rischio quali immunosoppressione (AIDS, soggetti trapiantati, malattie autoimmuni), radiazioni ultraviolette, pesticidi, diete particolari(5). Diversi meccanismi sono coinvolti nella patogenesi del DLBCL intervenendo sulla deregolazione del ciclo cellulare e dei pathways apoptotici, uno di questi è rappresentato dall'iperespressione di bcl-6. La traslocazione 3q27, dove il gene bcl-6 è localizzato, è osservata in circa il 35% dei DLBCL(4,6). La deregolazione del gene causa l'iperespressione di bcl-6, che inibisce l'apoptosi e la differenziazione dei precursori del centro germinativo promuovendo la formazione del clone maligno. Recentemente si è ipotizzato che l'attivazione del gene bcl-6 possa essere determinata dallo stato di acetilazione. La deacetilazione del gene inibisce la sua funzione di oncosoppressore, al contrario l'acetilazione ripristina le funzioni di "tumor suppressor" del gene.

La terapia del DLBCL prevede un protocollo polichemioterapico a base di antracicline (CHOP e CHOP-like) più o meno aggressivo rispettivamente per gli stadi avanzati con malattia disseminata e le forme iniziali(5). I pazienti che presentano "bulky-disease" al momento della presentazione clinica sono di routine irradiati dopo la fine della chemioterapia(5,7,8). A tale regime chemioterapico, dopo il 2001 è stato aggiunto un anticorpo monoclonale anti-CD20: Rituximab®, che ha comportato un significativo aumento nella sopravvivenza dei pazienti con DLBCL, stabilendo R-CHOP o R-CHOP-like come la nuova terapia standard(9,10). Ciò nonostante, solo il 50-60% dei

DLBCL degli adulti risponde alla terapia con lunghe sopravvivenze; il rimanente 50-40%, al contrario, presenta una prognosi sfavorevole poiché poco o parzialmente responsivi alle terapie con refrattarietà primaria o secondaria al trattamento e con brevi intervalli liberi da malattia (11). Di recente, sono stati introdotti un nuovo gruppo di farmaci, gli inibitori dell'istone deacetilasi (HDAC), nel trattamento di neoplasie ematologiche(12). In particolare, si sono dimostrati altamente sensibili al trattamento con gli inibitori dell'HDAC i linfomi cutanei T cellulari ed i linfomi T cellulari periferici "unspecified". In generale, i linfomi B cellulari sembrano non essere sensibili a questo tipo di farmaci con soli pochi casi di DLBCL, che hanno risposto parzialmente o completamente al trattamento(12,13). Gli inibitori dell'istone deacetilasi agiscono sul gruppo degli enzimi HDAC, inibiscono la rimozione dei gruppi acetilici e mantengono il DNA in uno stato trascrizionalmente attivo. Sebbene l'esatto meccanismo di azione antitumorale è sconosciuto, gli inibitori dell'HDAC possono indurre l'arresto del ciclo cellulare, differenziazione ed apoptosi delle cellule neoplastiche(12). Gli enzimi istone deacetilasi sono trovati overespressi in molti tipi di tumore e sono ritenuti partecipare nello sviluppo di malignità attraverso la soppressione di geni oncosoppressori come il gene bcl-6.

Nel corso degli ultimi decenni sono stati analizzati, sia dal punto di vista clinico che molecolare, numerosi potenziali parametri prognostici, per nessuno dei quali, però, sembra essere stata trovata una chiara associazione con la prognosi. Attualmente, la prognosi dei pazienti con DLBCL è valutata attraverso la formulazione di un International Prognostic Index (IPI)(14), introdotto nel 1993 come un nuovo ed indipendente fattore prognostico. In breve tempo l'IPI è diventato il fattore prognostico "gold-standard" che identifica quei soggetti che possono avere una evoluzione più aggressiva del linfoma e per i quali la terapia standard non è sufficiente, ma si rendono necessarie "strategie terapeutiche" più aggressive. L'IPI richiede la

formulazione di uno score basato su parametri clinici e di laboratorio: età, livelli sierici della lattato deidrogenasi (LDH), n° di siti extranodali coinvolti, “performance status” e stadio clinico(14). La variabilità di tali parametri clinici, che si riscontra nella pratica clinica, in realtà, non riflette altro che l'estrema variabilità biologica e genetica che contraddistingue questo linfoma(15).

## 2. Profilo molecolare

Recenti studi, condotti con la “gene array technology”, hanno analizzato il profilo di attivazione genica del DLBCL. Attraverso questi studi è stato dimostrato che il DLBCL può essere diviso in sottogruppi molecolarmente distinti con un profilo di espressione genica “Germinal Center B-cell (GCB) -like”, “Activated B-Cell (ABC) -like ed un TIPO 3(16,17). I sottogruppi GCB e ABC DLBCL sono identificati in base al loro pattern di espressione genica, che ricorda rispettivamente le cellule B normali del centro germinativo e le cellule B periferiche attivate; mentre il TIPO 3, inizialmente poco caratterizzato, oggi si ritiene che sia un gruppo eterogeneo con comportamento e prognosi simile all'ABC DLBCL(17). Il gruppo di pazienti con GCB DLBCL presenta una sopravvivenza significativamente migliore (60%) rispetto al gruppo ABC oppure TIPO 3 DLBCL, rispettivamente del 35 e del 39%(17). Attualmente, i sottogruppi ABC ed il TIPO-3 sono stati raggruppati in un unico gruppo genericamente indicato come “non-GCB” DLBCL(17,18).

La possibilità di stabilire di fronte a quale sottotipo ci troviamo può permettere ai clinici di determinare quali pazienti avrebbero una ridotta possibilità di remissione dopo terapia standard e suggerire, quindi, chi possa essere candidato ad un trattamento più aggressivo. L'utilizzo, però, di tecniche come c-DNA(16,17) ed oligonucleotidi microarrays(19), non sono utilizzate di routine in tutti i laboratori perché presentano costi elevati e personale qualificato. Quindi è necessario, per poter sottoclassificare il



DLBCL in gruppi prognosticamente distinti, ricorrere a metodiche più semplici come l'immunoistochimica, tecnica con più ampia diffusione e generalmente utilizzata nella pratica clinica rispetto a tecniche di biologia molecolare.

Il GCB DLBCL esprime un profilo fenotipico simile a quello delle cellule B normali del centro germinativo (CD10+; bcl-6+;CD38+)(2); mentre il non-GCB DLBCL è caratterizzato da un assetto antigenico simile a quello indotto durante l'attivazione in vitro di cellule B periferiche (MUM1/IFR4+; CD138+)(2). Sia CD10 che bcl-6 sono considerati markers del centro germinativo, mentre MUM-1/IFR4 è espresso da plasmacellule ed in un sottotipo cellulare nella zona chiara del centro germinativo. In alcuni studi è stata valutata, su tissue microarray, l'espressione immunoistochimica di CD10, bcl-6 e MUM-1(15). Tali anticorpi selezionati riconoscono molecole la cui espressione dei relativi mRNA era altamente associata con i gruppi GCB e non-GCB negli studi che utilizzano cDNA micrarrays. Questi tre markers, reattivi in tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina, sono differentemente espressi in GCB e non-GCB DLBCL, quindi i sottogruppi GCB e non-GCB di DLBCL possono essere accuratamente differenziati usando un pannello immunofenotipico costituito soltanto da questi tre markers(15,18).

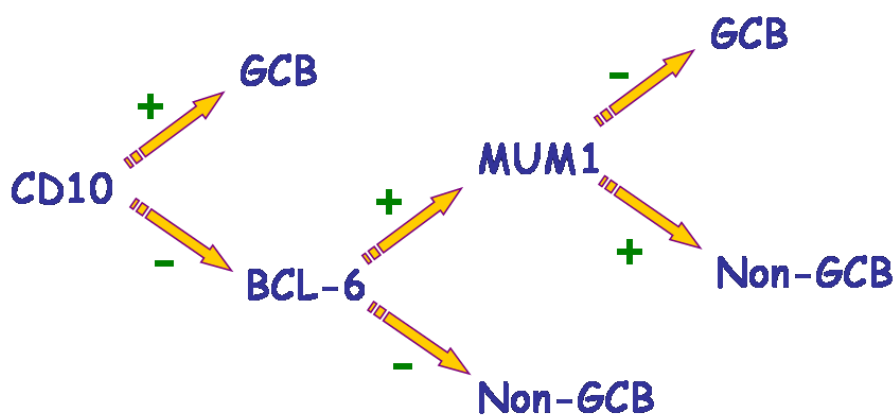


Fig. 1- Algoritmo fenotipico

Dato che CD10 e bcl-6 sono markers delle cellule B del centro germinativo, quando CD10 soltanto o CD10 e bcl-6 sono positivi, i pazienti sono assegnati al gruppo GCB; quando, invece, entrambi gli anticorpi sono negativi i pazienti sono automaticamente assegnati al gruppo non-GCB. Nell'eventualità in cui CD10 è negativo, mentre bcl-6 è positivo, l'espressione di MUM-1 determina il gruppo: se MUM-1 è negativo il paziente è assegnato nel gruppo GCB; al contrario, quando c'è positività di quest'ultimo il paziente è assegnato al gruppo non-GCB (figura1)(20).

Confrontando i risultati ottenuti con questo pannello di immunoistochimica e quelli dell'espressione genica mediante cDNA microarray, sono stati riprodotti i risultati nel 71% dei casi classificati GCB e nell'88% dei casi classificati non-GCB(18).

### 3. Citologia e tecniche ancillari

L'accuratezza diagnostica della FNC nel distinguere proliferazioni linfoidi reattive da proliferazioni maligne risulta notevolmente aumentata affiancando, alla valutazione morfologica, l'utilizzo di tecniche ancillari che permettono di valutare la clonalità della popolazione in esame e di sottotipizzare i LNH(21,22). L'immunocitochimica (ICC) e la citofluorimetria (CF) rappresentano le metodiche di più comune e consolidato impiego nell'immunofenotipizzazione cellulare(23). L'identificazione mediante metodiche immunologiche (immunofenotipizzazione) ha subito un impulso fondamentale con la produzione e la standardizzazione di anticorpi monoclonali rivolti verso antigeni cellulari e con il loro inquadramento in gruppi distinti definiti cluster di differenziazione (CD). Questi reagenti risultano capaci, quindi, di riconoscere marcatori propri delle diverse linee cellulari e delle differenti fasi maturative. La complessità dell'immunofenotipo cellulare richiede l'impiego contemporaneo di anticorpi monoclonali diversi, al fine di definire e di inquadrare correttamente la popolazione neoplastica in una

classificazione diagnostica; praticamente nessuno degli anticorpi monoclonali di uso routinario risulta neoplasia specifico, ma una valutazione critica dei risultati che derivano dall'impiego di questi reagenti consente quasi sempre una diagnosi accurata.

L'ICC utilizza una sonda, l'anticorpo monoclonale, per rilevare la presenza dell'antigene specifico, in genere una proteina, da esso riconosciuto. L'immunofenotipizzazione mediante ICC si effettua, a seconda del tipo di campione direttamente su striscio, su citocentrifugati o su materiale citoincluso. I principali vantaggi dell'ICC consistono nella necessità di un minor numero di cellule rispetto alla citofluorimetria e nella preservazione dell'integrità cellulare, consentendo di associare l'indagine morfologica allo studio dell'assetto fenotipico(24).

La FC è una tecnica che consente l'analisi di popolazioni cellulari complesse attraverso la quantificazione contemporanea di numerosi parametri fisici e molecolari di ogni singola cellula di cui la popolazione è composta. I campioni che possono essere analizzati in citofluorimetria consistono in popolazioni cellulari, semplici o complesse, che soddisfano due requisiti: trovarsi in sospensione in un liquido ed essere vitali. Poiché l'analisi viene effettuata su cellule vive, è fondamentale che qualsiasi campione giunga fresco al laboratorio, sospeso in soluzione fisiologica o in tampone fosfato. L'analisi di una grande quantità di cellule in breve tempo, 1000 o più al secondo, è resa possibile da un sistema di flusso laminare che costringe le cellule ad allinearsi e passare una alla volta nella camera di analisi. In quest'ultima, le cellule vengono intercettate da un fascio di luce, i cui componenti vengono variamente modificati dall'incontro con la cellula, a seconda delle sue dimensioni e della complessità strutturale. In base a come viene modificato il fascio luminoso è possibile ottenere informazioni sulle caratteristiche fisiche delle cellule; più precisamente, il rilevamento della quantità di luce dispersa frontalmente e lateralmente rispetto al fascio di luce incidente permette di

rilevare le caratteristiche fisiche della cellula. La dispersione lineare o frontale è la quantità di luce che viene trasmessa lungo lo stesso asse attraverso il quale viaggia il raggio luminoso e viene misurata da un fotodiodo posto frontalmente al percorso ottico della luce laser. La quantità di luce che riesce a raggiungere il fotodiodo rilevatore, essendo legato alla diffrazione della luce da parte della cellula, è direttamente proporzionale alle sue dimensioni. La dispersione laterale o ortogonale viene rilevata da un tubo fotomoltiplicatore posto in posizione ortogonale alla sorgente luminosa; esso quindi raccoglie in modo selettivo, per mezzo di un filtro dicroico, la luce deviata da ciascuna cellula a un angolo di  $90^\circ$  rispetto alla luce incidente. La quantità di luce deviata a tale angolazione è legata alla rifrazione della luce da parte della cellula, perciò è in relazione proporzionale alla sua complessità interna (forma e dimensioni del nucleo, granularità del citoplasma, che dipende dal tipo e dalla quantità di organelli intracitoplasmatici). Risulta ovvio che la quantità di luce rifratta lateralmente da un granulocita è molto più elevata di quella rifratta da un linfocita per la maggiore quantità di granulazioni citoplasmatiche e la maggiore irregolarità di forma del nucleo. Inoltre, è possibile evidenziare e quantificare contemporaneamente diverse molecole di membrana e intracellulari mediante la colorazione diretta o indiretta di ciascuna di esse con sostanze fluorescenti che si legano in maniera stechiometrica alla molecola di interesse. Queste ultime assorbono energia luminosa di lunghezza d'onda adeguata e la rimettono a lunghezza d'onda maggiore, ovvero con segnale fluorescente. La luce fluorescente emessa da ciascuna cellula viene rilevata da un tubo fotomoltiplicatore posto lateralmente, ad angolo variabile, rispetto alla sorgente di luce. Per rendere più accurata e selettiva tale misurazione, ogni tubo fotomoltiplicatore è preceduto da un filtro ottico che seleziona la lunghezza d'onda caratteristica del fluorocromo in esame. Il legame tra il fluorocromo e la molecola che si vuole quantificare può essere diretto o indiretto. I segnali vengono inviati ad

un elaboratore elettronico dove le caratteristiche di un gran numero di cellule, generalmente 10-15.000, vengono registrate e possono essere richiamate dall'operatore sottoforma di informazioni statistiche organizzate in tabulati associati a rappresentazioni grafiche (citogramma o istogramma)(24).

## SCOPO PROGETTO DI RICERCA

Tenendo conto dei notevoli vantaggi legati alla metodica (FNC): semplicità e non invasività, ripetibilità con la possibilità di eseguire prelievi multipli anche in potenziali serie temporali (es: pre- e post-terapia), possibilità di ottenere con tale metodica un campionamento “selettivo” delle cellule neoplastiche ed, infine, di applicare, anche su campione citologico, tecniche ancillari (FC, ICC) che permettono una immunofenotipizzazione, ci siamo proposti con il nostro studio di:

- valutare una possibile definizione dei due sottogruppi GCB e non-GCB di DLBCL, su campioni citologici, in base ai patterns di espressione di specifici markers quali: CD10, BCL-6 e MUM1/IRF4 mediante immunocitochimica e citofluorimetria;
- stabilire il ruolo potenziale della citologia per ago sottile nel selezionare pazienti con DLBCL per terapie “mirate”;
- stabilire se la definizione fenotipica di questi sottogruppi ha significato prognostico per pazienti con “de novo” DLBCL.

## CASISTICA

In considerazione del fatto che è uno studio prospettico sono stati arruolati nella nostra casistica, da novembre 2006 a settembre 2009, 30 pazienti (10 M; 20 F), età media 63,7 anni (range 41-88 aa), afferenti al nostro servizio di Fitopatologia, poiché presentavano tumefazioni linfonodali e non, superficiali e profonde. Per tutti i pazienti è stata fatta una diagnosi su FNC di linfoma a grandi cellule B diffuso. Sono stati arruolati nel nostro studio soltanto forme “de novo”, escludendo quelle forme sviluppatesi in pazienti immunodepressi (HIV pos o trapiantati) e quelle forme di linfomi di basso grado trasformatesi in linfomi di alto grado. Quasi tutti i pazienti (27/30) presentavano una localizzazione esclusivamente linfonodale; per 2/30 pazienti, al momento della presentazione clinica, c’era una localizzazione linfonodale ed extralinfonodale (tessuti molli parete toracica) ed, infine, in 1/30 paziente la malattia presentava una localizzazione esclusivamente extralinfonodale (ghiandola parotide/guancia dx). In 5 casi la localizzazione era ai linfonodi profondi. In due pazienti c’era “bulky-disease” (TAB I) La nostra diagnosi citologica è stata confrontata con la diagnosi istologica disponibile solo per 20/30 pazienti; in tutti i casi il controllo istologico confermava la diagnosi di DLBCL.

Come primo step del nostro lavoro sono state eseguite prove di fattibilità e, successivamente, abbiamo provveduto alla raccolta e processazione del materiale diagnostico. In tutti i casi abbiamo applicato lo stesso protocollo consistente nell’esecuzione di tre ago aspirati. Il materiale ottenuto dal primo ago aspirato è stato opportunamente strisciato ottenendo in media due vetrini. Uno dei vetrini viene fatto fissare all’aria e colorato con metodica Giemsa e valutato “on-site” per l’adeguatezza e per la formulazione di un primo orientamento diagnostico; l’altro vetrino è stato fissato in alcool e

colorato con metodica Papanicolaou. Entrambi i vetrini sono stati utilizzati infine per la diagnosi morfologica. Dal materiale del secondo ago aspirato è stata ottenuta una sospensione in PBS, che è stata divisa in aliquote che vengono marcate con anticorpi fluorescinati e poi “letti” al citofluorimetro, attraverso cui è possibile tipizzarli e quantificarli. Infine, il materiale ottenuto dal terzo ago aspirato è stato strisciato su vetrini fatti fissare in alcool e conservati per successive metodiche di immunocitochimica.

## TAB I – caratteristiche cliniche

| paziente | età | sesto | Sede  | follow up          | notizie cliniche                               |
|----------|-----|-------|---|--------------------|--|
| 1        | 62  | F     | linfonodo sovraclaveare e latero cervicale sin        | 30 mesi            |  |
| 2        | 61  | M     | linfonodo latero cervicale ed ascellare destro        | 16 mesi            | pregresso DLBCL                                |
| 3        | 55  | F     | linfonodo sovraclaveare destro                        | 28 mesi            |  |
| 4        | 72  | F     | linfonodo ascellare destro e latero cervicale sin sup | 25 mesi            | Bulky-disease                                  |
| 5        | 88  | F     | linfonodo inguinale sin                               | 25 mesi            |  |
| 6        | 69  | M     | linfonodo paraaortico                                 | 29 mesi            | pregresso DLBCL                                |
| 7        | 60  | F     | linfonodo laterocervicale sinistro                    | 29 mesi            | pregresso DLBCL                                |
| 8        | 57  | M     | linfonodo latero cervicale ed ascellare sinistro      | 8 mesi             |  |
| 9        | 76  | F     | linfonodo fossa iliaca destra                         | 23 mesi            |  |
| 10       | 69  | M     | linfonodo paraaortico                                 | 29 mesi            | pregresso DLBCL                                |
| 11       | 78  | F     | massa retroperitoneale                                | 1 mese             |  |
| 12       | 58  | F     | linfonodo sottomandibolare dx                         | 36 mesi            |  |
| 13       | 62  | F     | guancia dx  | 22 mesi            | pregresso DLBCL                                |
| 14       | 79  | M     | linfonodo sovraclaveare e angolo mandibolare sin      | 24 mesi            |  |
| 15       | 69  | M     | linfonodo laterocervicale sin                         | 36 mesi            | pregresso DLBCL                                |
| 16       | 58  | F     | linfonodo sottomandibolare dx                         | 36 mesi            |  |
| 17       | 41  | F     | linfonodo latero cervicale destro                     | 36 mesi            |  |
| 18       | 74  | M     | linfonodo laterocervicale destro                      | 36 mesi            |  |
| 19       | 44  | F     | linfonodo sovraclaveare sin + parete toracica         | 33 mesi            | Bulky-disease                                  |
| 20       | 76  | M     | linfonodo ascellare e parete toracica sin             | 35 mesi            |  |
| 21       | 45  | F     | linfonodo laterocervicale sin                         | 34 mesi            |  |
| 22       | 82  | F     | linfonodo inguinale sin                               | 33 mesi            |  |
| 23       | 59  | F     | linfonodo sottomandibolare sin                        | 13 mesi (deceduto) | infiltrazione leptomeningea dopo 12 mesi       |
| 24       | 60  | M     | linfonodo sottomandibolare destro                     | 32 mesi            | infiltrazione gamba destra dopo 12 mesi        |
| 25       | 77  | F     | linfonodo laterocervicale dx e sovraclaveare sin      | 36 mesi            |  |
| 26       | 46  | F     | linfonodo iliaco dx                                   | 36 mesi            |  |
| 27       | 71  | F     | linfonodo laterocervicale dx e sovraclaveare sin      | 32 mesi            |  |
| 28       | 45  | M     | linfonodo ascellare dx                                | 35 mesi            |  |
| 29       | 68  | F     | linfonodo latero cervicale dx e inguinale sin         | 33 mesi            | interessamento linf sup e profondi dopo 3 mesi |
| 30       | 49  | F     | linfonodo inguinale dx                                | 20 mesi            | pregresso DLBCL                                |



## METODI

Le sospensioni cellulari in PBS per la citofluorimetria sono state processate entro due ore dal prelievo: inizialmente sono state lavate due volte tramite centrifugazione per 4 minuti a 2500 rotazioni per minuto, poi il supernatante è stato rimosso ed aggiunti 400 microlitri di PBS. Quando si è ritenuto che fossero disponibili un numero sufficiente di cellule, la sospensione finale è stata divisa in quattro cuvette più una quinta, che è stata messa da parte fino alla fine della procedura allo scopo di avere altro materiale utilizzabile in caso di risultati insoddisfacenti o nel caso ci fosse bisogno di un test supplementare. Le prime quattro cuvette sono state incubate per 15 minuti al buio con 10 microlitri della seguente combinazione di anticorpi coniugati con ficoeritrina (PE), peridinclorofillina (PERCP), fluoresceinaisotiocianato (FITC): CD5/CD10/CD19, FMC7/CD23/CD19; CD19/catene leggere Kappa/ catene leggere Lambda e con l'anticorpo monoclonale fluorescinate bcl-2 (TAB II). Dopo l'incubazione, i globuli rossi sono stati lisati con soluzione lisante a base di cloridio di ammonio (diluita al 10%) per 5 minuti e poi lavati. Nel caso in cui fossero presenti ancora piccoli frammenti, la sospensione è stata filtrata attraverso un filtro di 50 micron. Infine, una parte uguale di paraformaldeide all'1% è stata aggiunta in ogni tubo per la fissazione delle cellule. La tipizzazione citofluorimetrica è stata effettuata utilizzando un Citofluorimetro FACS-SCAN (Beckton-Dikinson) a tre colori in dotazione al Dipartimento di Anatomia Patologica e Citopatologia. Sono stati acquisiti almeno 5000 "eventi" (complessi cellula-anticorpo con fluorocromo coniugato) per campione; gli eventi acquisiti sono stati riportati sul monitor e selezionati mediante "gate" disegnati in ragione degli specifici parametri fisici dei linfociti. I gate ottenuti sono stati quindi analizzati valutando l'eventuale espressione e/o coespressione dei rispettivi anticorpi coniugati e quantificati per valori assoluti e percentuali.

La tripletta CD5/CD10/CD19 permette di differenziare i linfociti T e B. La coespressione CD10/CD19 consente, inoltre, di identificare tra questi ultimi l'eventuale presenza di linfociti centrofollicolari. Le catene leggere Kappa e Lambda, quando espresse, sono state valutate attraverso la loro espressione percentuale e coespressione con CD19. Un rapporto compreso tra 3:1 e 1:1 è considerato nei limiti fisiologici; rapporti uguali o maggiori di 4:1 oppure uguali o minori di 1:3 sono generalmente ritenuti espressione di monoclonalità (rispettivamente per Kappa o per Lambda) quando espressi in più del 20% delle cellule CD19 positive. Nell'analisi dei campioni sono stati inseriti controlli adeguati da utilizzare in fase di analisi e di interpretazione dei dati.

I vetrini fissati in alcool e conservati per l'immunocitochimica sono stati inizialmente idratati con una scala alcolica discendente fino all'H<sub>2</sub>O. Come passaggio successivo è stato eseguito lo smascheramento antigenico, che è stato eseguito in una soluzione EDTA o in una soluzione di citrato di sodio rispettivamente per bcl-6 e per MUM-1 attraverso un ciclo da 5 min in forno a microonde settato ad una potenza di 350 watt. Dopo il riscaldamento i vetrini sono stati raffreddati gradualmente in acqua di fonte per circa 10 min. A questo punto è stato effettuato il blocco delle perossidasi endogene, necessario per evitare che tali enzimi possano dar luogo a reazioni aspecifiche (falsi positivi). Il blocco è stato ottenuto con post-fissazione in metanolo perossido al 3% per 10 min.; dopo di che la reazione è stata arrestata ponendo i vetrini in acqua distillata per altri 10 min. Successivamente, sono stati lasciati in Tris-Buffer Saline (TBS) a pH 7.4-7.6 con un detergente (Twin). A questo punto della reazione è stato aggiunto l'anticorpo primario (TAB II), che è stato incubato per 1 h a temperatura ambiente; dopo di che sono stati eseguiti 3 lavaggi in TBS da 5 min. ognuno. A questo punto della reazione la somministrazione dell'anticorpo secondario biotinilato (15 min. a temperatura ambiente) è stato lo step successivo con

altri tre lavaggi in TBS di 5 min. ognuno. E' stata, poi, aggiunta la streptavidina (DAKO) per 15 min a temperatura ambiente e nuovo lavaggio in TBS. Il segnale è stato sviluppato usando il cromogeno diaminobenzidina (DAKO) con perossido di idrogeno come substrato. La reazione è stata terminata con l'immersione in H<sub>2</sub>O distillata e rapido contrasto in Ematossilina/Eosina. Come passaggio finale i vetrini sono stati disidratati in una scala degli alcoli, diafanizzati in xilene e montati con coprioggetto. L'omissione dell'anticorpo specifico e l'utilizzo di anticorpi non correlati sono stati usati come controlli negativi.

Tab II - Anticorpi utilizzati nello studio

| <b>Anticorpi utilizzati per la citofluorimetria:</b>                     | <b>Anticorpi utilizzati per l'immunoistochimica:</b> |
|--|--|
| CD19, catene leggere Kappa, catene leggere Lambda<br>( Beckton-Dikinson) | BCL-6<br>(policlonale; SANTACRUZ 1:75)               |
| CD10<br>(Beckton-Dikinson)   | MUM-1<br>(MUM 1p; Falini et al 1:10)                 |

## RISULTATI

Sono stati esaminati 30 casi di FNC, 29 linfonodali ed 1 extralinfonodale, con diagnosi citologica di DLBCL. Il riscontro istologico era disponibile in 20 casi; in tutti questi casi la diagnosi citologica è stata confermata. In 23 casi si trattava di una prima diagnosi; nei restanti 7 casi è stata fatta una diagnosi di recidiva.

Attraverso la citofluorimetria è stata valutata in tutti i campioni l'espressione di CD10; il nostro cut off è stato fissato per valori  $\geq 20\%$ .

In 11 campioni CD10 è risultato positivo con valori percentuali che variano da 20 a 60 % (TAB III). Quindi in base al nostro algoritmo fenotipico (fig.1) questi pazienti (CD10+) sono stati inseriti nel gruppo GCB.

Nei 19 campioni CD10 negativi è stata valutata l'espressione di bcl-6, risultata negativa in 13 pazienti (TAB III). Questi campioni con doppia negatività (CD10-; bcl-6-) sono stati inseriti nel gruppo non-GCB.

Per i restanti 6 campioni (TAB III), dove bcl-6 è risultata positiva, è stata valutata l'espressione di MUM-1. Quest'ultima è risultata positiva in 4 campioni e conseguentemente questi pazienti (CD10-; bcl-6+; MUM-1+) sono stati inseriti nel gruppo non-GCB; mentre i 2 pazienti che presentavano negatività per MUM-1 (CD10-; bcl-6+; MUM-1-) sono stati inseriti nel gruppo GCB.

E' stata valutata, inoltre, l'espressione di bcl-6 negli 11 campioni CD10 positivi, 6 dei quali sono risultati bcl-6 positivi. Inoltre, MUM-1 è risultata positiva in 2 dei casi CD10 e bcl-6 negativi.

Per tutti i pazienti avevamo a disposizione i dati del follow up, periodo medio di 28 mesi (range 1-36 mesi) (TAB I). In due casi, dopo 12 mesi, in corso di

chemioterapia, dopo iniziale risposta al trattamento, si è avuto una ripresa della malattia con localizzazione rispettivamente leptomenigea e con decorso infausto dopo un mese, ed ai tessuti molli della gamba, con parziale risposta ad un nuovo trattamento chemioterapico più aggressivo. In un terzo caso si è avuto coinvolgimento di altre stazioni linfonodali superficiali e profonde dopo tre mesi dalla prima diagnosi.

TAB III- Risultati valutazione citofluorimetrica ed immunocitochimica

| paziente | età | Sesso | restizione catene<br>leggere | CD19<br>% | CD10<br>% | espressione<br>CD10 % | bcl-6 | MUM-1 |
|----------|-----|-------|------------------------------|-----------|-----------|-----------------------|-------|-------|
| 1        | 62  | F     | Kappa                        | 77        | 30        | > 20                  |       |       |
| 2        | 61  | M     | Lambda                       | 29        | 30        | > 20                  |       |       |
| 3        | 55  | F     | Kappa                        | 61        | 0         | < 20                  | neg   |       |
| 4        | 72  | F     | Kappa                        | 25        | 1         | < 20                  | pos   | pos   |
| 5        | 88  | F     | Lambda                       | 57        | 22        | > 20                  |       |       |
| 6        | 69  | M     | Kappa                        | 28        | 0         | < 20                  | neg   |       |
| 7        | 60  | F     | catene non espresse          | 46        | 0         | < 20                  | neg   |       |
| 8        | 57  | M     | Lambda                       | 45        | 34        | > 20                  |       |       |
| 9        | 76  | F     | non espresse                 | 36        | 33        | > 20                  |       |       |
| 10       | 69  | M     | Kappa                        | 28        | 20        | > 20                  |       |       |
| 11       | 78  | F     | non espresse                 | 65        | 40        | > 20                  |       |       |
| 12       | 58  | F     | Kappa                        | 42        | 0         | < 20                  | neg   |       |
| 13       | 62  | F     | Kappa                        | 80        | 0         | < 20                  | pos   | neg   |
| 14       | 79  | M     | Kappa                        | 45        | 0         | < 20                  | pos   | neg   |
| 15       | 69  | M     | non espresse                 | 31        | 25        | > 20                  |       |       |
| 16       | 58  | F     | Kappa                        | 42        | 0         | < 20                  | neg   |       |
| 17       | 41  | F     | Kappa                        | 32        | 0         | < 20                  | neg   |       |
| 18       | 74  | M     | Kappa                        | 37        | 37        | > 20                  |       |       |
| 19       | 44  | F     | non espresse                 | 28        | 3         | < 20                  | neg   |       |
| 20       | 76  | M     | Lambda                       | 18        | 0         | < 20                  | neg   |       |
| 21       | 45  | F     | Kappa                        | 30        | 0         | < 20                  | pos   | pos   |
| 22       | 82  | F     | Kappa                        | 22        | 1         | < 20                  | neg   |       |
| 23       | 59  | F     | Kappa                        | 20        | 0         | < 20                  | neg   |       |
| 24       | 60  | M     | Lambda                       | 60        | 60        | > 20                  |       |       |
| 25       | 77  | F     | Lambda                       | 45        | 0         | < 20                  | neg   |       |
| 26       | 46  | F     | non espresse                 | 47        | 39        | > 20                  |       |       |
| 27       | 71  | F     | non espresse                 | 20        | 0         | < 20                  | neg   |       |
| 28       | 45  | M     | Kappa                        | 27        | 0         | < 20                  | pos   | pos   |
| 29       | 68  | F     | Kappa                        | 50        | 0         | < 20                  | pos   | pos   |
| 30       | 49  | F     | non espresse                 | 48        | 0         | < 20                  | neg   |       |

## DISCUSSIONE

Lo studio delle linfadenopatie rappresenta ormai uno dei principali campi di applicazione della FNC, utile sia come primo step diagnostico che in corso di follow up(21,22). La possibilità di applicare tecniche ancillari anche su campioni citologici ha permesso di poter non solo valutare le caratteristiche citologiche, ma anche quelle fenotipiche della popolazione linfoide in esame(23). Pertanto, la possibilità di diagnosticare e sottotipizzare i LNH ha reso la FNC uno strumento da affiancare alla biopsia escissionale o, addirittura, può rappresentare una potenziale valida alternativa(21,23).

La possibilità di formulare una accurata diagnosi citologica di LNH, anche in prima diagnosi, è strettamente correlata alla capacità della FNC di fornire non solo una diagnosi morfologica, ma anche una corretta sottotipizzazione delle singole entità patologiche, in accordo con la classificazione WHO(4). L'indicazione generica di LNH oppure di LNH a grandi o a piccole cellule non è, infatti, sufficientemente precisa per permettere una corretta gestione clinica e terapeutica del paziente; formulare una diagnosi così poco specifica renderà inevitabile il ricorso alla biopsia escissionale. Attualmente, però, la valutazione combinata delle caratteristiche microscopiche e di assetti fenotipici che possono essere considerati specifici di determinati LNH, ne permette una corretta diagnosi e sottotipizzazione in una buona percentuale di casi. Appare evidente, pertanto, l'importanza della scelta delle specifiche tecniche ancillari da applicare, che deve necessariamente ricadere su quelle in grado di fornire il maggior numero di informazioni utili. E' necessario quindi utilizzare algoritmi diagnostici razionali, che permettano di formulare diagnosi corrette, riducendo costi umani ed economici che deriverebbero da una applicazione indiscriminata di tutte le tecniche a disposizione.

Per quanto riguarda i LNH a grandi cellule, come il DLBCL, l'identificazione del corretto assetto fenotipico può consentire, quindi, una sottotipizzazione corretta della neoplasia, laddove i dati emersi dalla sola valutazione morfologica non consentirebbero una corretta diagnosi differenziale. Per questi casi può essere contributivo, nella formulazione della diagnosi, integrare i dati citofluorimetrici con quelli di immunocitochimica.

Nel nostro studio l'applicazione della citofluorimetria ha consentito non solo di discriminare, ai fini diagnostici, se fosse una popolazione clonale di tipo B (CD19 positiva con restrizione per le catene leggere Kappa o Lambda), ma anche di valutare l'espressione di CD10 e di poterla quantificare. Poter valutare l'espressione di CD10, marker delle cellule B del centro germinativo, attraverso la citofluorimetria, è risultata essere tecnicamente vantaggioso, poiché è possibile ottenere con un'unica tecnica, "ottimizzando" quindi il materiale aspirato, informazioni utili sia per la diagnosi morfologica sia per la valutazione del fenotipo. Quindi, la valutazione di CD10 attraverso la citofluorimetria ha permesso di soddisfare il primo step del nostro algoritmo fenotipico (fig.1) e di fare una prima sottotipizzazione del DLBCL, inserendo nel gruppo GCB i casi CD10 positivi e candidando quei casi che sono risultati essere CD10 negativi ad indagini immunocitochimiche per la valutazione degli altri 2 markers che costituiscono il nostro algoritmo (fig.1).

Gli 11 casi GCB (CD10 +) hanno presentato un valore percentuale di CD10 compreso tra 20 e 60%. Il rapporto tra la popolazione CD10 positiva e la popolazione B cellulare CD19 positiva è compreso tra 1:1 o 1:2/2,5.

Per quanto riguarda il potenziale valore dell'espressione di CD10 come marker prognostico, esistono in letteratura studi con risultati contrastanti. Alcuni autori ritengono che non ci sia correlazione con la prognosi(11), altri che possa essere, insieme ad altri markers, un buon fattore prognostico(2), indipendente dal IPI. Comunque, al di là di tali speculazioni, sicuramente il

poter stabilire se una popolazione cellulare è CD10 positiva ed il poter quantificare la sua percentuale di espressione, rispetto alla popolazione neoplastica CD19 positiva, è molto importante dal punto di vista terapeutico.

Per i 19 casi CD10 negativi all'indagine citofluorimetrica, è stata valutata l'espressione di bcl-6, altro marker centrollicolare, e di MUM-1, mediante prove di immunocitochimica. BCL-6 è risultata negativa in 13 campioni. La doppia negatività CD10 e bcl-6 ha permesso di inserire questi pazienti nel sottogruppo non-GCB, prognosticamente sfavorevole. Nei 6 casi bcl-6 positivi la sottotipizzazione in GCB o non-GCB è stata resa possibile valutando l'espressione di MUM-1, la cui negatività o positività ha permesso di inserire questi ultimi casi rispettivamente nel gruppo non-GCB o GCB.

In totale della nostra casistica, una volta valutata l'espressione dei tre markers (CD10+/-; bcl6+/-; MUM-1+/-), 13 (43,3%) campioni sono risultati essere GCB DLBCL, mentre 17 (56,7%) sono non-GCB DLBCL(TAB IV).

TAB IV – Sottotipi di DLBCL in base al fenotipo

| FENOTIPO                       | GCB | non-GCB |
|--------------------------------|-----|---------|
| CD10 pos                       | 11  |         |
| CD10 neg; bcl-6 neg            |     | 13      |
| CD10 neg; bcl-6 pos; MUM-1 pos |     | 4       |
| CD10 neg; bcl-6 pos; MUM-1 neg | 2   |         |
| TOTALE                         | 13  | 17      |

Quindi l'algoritmo fenotipico (fig.1), altrove utilizzato su campioni istologici(15, 18), è sicuramente applicabile anche su campione citologico e ha permesso la sottotipizzazione del DLBCL nei due distinti gruppi prognostici GCB e non-GCB. Tale sottotipizzazione di DLBCL in un gruppo o nell'altro, su campione citologico, ci consentirà di poter selezionare quei pazienti che necessiteranno di un trattamento più aggressivo, sfruttando tutti i vantaggi legati alla tecnica (tollerabilità, ripetibilità e bassi costi).



Altro dato importante, per lo più di tipo tecnico, è stata la sottotipizzazione del DLBCL in gruppi prognosticamente distinti, attraverso tecniche ancillari di più comune impiego (FC ed ICC), rispetto a tecniche di biologia molecolare che presentano costi più elevati, richiedono laboratori opportunamente attrezzati e personale specializzato.

Una volta sottotipizzato i nostri casi attraverso l'applicazione dell'algoritmo fenotipico CD10, bcl-6 e MUM-1 nei due sottogruppi GCB e non-GCB, abbiamo revisionato i vetrini morfologici corrispondenti ad ogni caso cercando di individuare aspetti morfologici tipici di un sottogruppo o dell'altro. In tutti i casi la morfologia è risultata sovrapponibile e non è stato possibile individuare caratteristiche che si ripetessero più frequentemente nel gruppo GCB o non-GCB. Se ne deduce che la morfologia da sola è insufficiente per sottotipizzare il DLBCL confermando e rafforzando l'importanza della valutazione dell'assetto fenotipico per individuare quei pazienti che necessiteranno di un trattamento più aggressivo.

Nella nostra piccola serie per 7 pazienti si trattava di recidiva di un pregresso DLBCL. Mediante la valutazione dell'algoritmo fenotipico, 4 di questi pazienti sono stati inseriti nel gruppo non-GCB a prognosi peggiore; gli altri 3 pazienti sono risultati CD10 positivi e quindi sono stati inseriti nel gruppo GCB a prognosi migliore. Per 3 dei 4 pazienti non-GCB avevamo a disposizione nel nostro archivio il precedente profilo citofluorimetrico, relativo alla prima diagnosi, con la valutazione di CD10, che risultava non espresso in tutti e tre i casi, confermando che la mancanza di espressione di CD10 ha un significato da un punto di vista prognostico. Problemi interpretativi sono stati posti, invece, dagli altri tre pazienti che, pur presentando positività per CD10, comunque avevano avuto una recidiva. Per questi pazienti è stata valutata, indipendentemente dal nostro schema di lavoro, l'espressione sia di bcl-6 che di MUM-1; la prima risultata negativa in tutti i casi, mentre MUM-1 è risultato positivo in 2 casi. Ovviamente a questi risultati non è possibile attribuire alcun

significato statistico, però permettono di fare alcune considerazioni, da confermare su casistiche molto più ampie, sul possibile ruolo dell'espressione di CD10 come fattore prognostico e di come MUM-1 possa avere un ruolo nell'influenzare negativamente la prognosi, nonostante sia conservata l'espressione di CD10. Considerazioni simili, inoltre, possono essere fatte per i due casi che in corso di terapia hanno avuto una ripresa di malattia, entrambi dopo 12 mesi, rispettivamente, con infiltrazione leptomeningea ed infiltrazione dei tessuti molli della gamba. Nel primo caso il paziente era stato inserito nel gruppo non-GCB (CD10-; bcl-6-), mentre il secondo caso era stato inserito nel gruppo GCB (CD10+) ma contemporaneamente presentava positività anche per MUM-1.

Dimostrare, attraverso i risultati ottenuti, che esiste effettivamente una correlazione tra il profilo fenotipico, valutato, in questo progetto di ricerca, su campioni citologici, la responsività terapeutica e la sopravvivenza, non è possibile sia perché i numeri sono statisticamente irrilevanti sia perché sono necessari periodi più lunghi di follow up. Possiamo, però, considerare questi risultati "promettenti" ed un buon punto di partenza per ulteriori valutazioni su una casistica più ampia e valutando eventualmente altri fattori correlandoli con una buona o cattiva prognosi.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma: the Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997;89:3909-391
- 2) Colomo L, Lopez-Guillermo A, Perales M, Rives S, Martinez A, Bosch F, Colomer D, Falini Brunangelo, Montserrat E, Campo E. Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunphenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2003;101:78-84.
- 3) Bea S, Zettl A, Wright G, Salaverria I, Jehn P, Moreno V, Burek C, Ott G, PuigX, Yang L, Lopez-Guillermo A, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Gascoyne RD, Connors JM, Grogan TM, Braziel R, Fisher RI, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Simon R, Powell J, Wilson WH, Jaffe ES, Montserrat E, Muller-Hermelink HK, Staudt LM, Campo E, Rosenwald A; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005;106:3183-90.
- 4) ES Jaffe, NL Harris, H Stein, JW Vardiman. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO 2001
- 5) Friedberg JW. Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2008;22:941-952.
- 6) Sheth A, de Melo VA, Szydlo R, Macdonald DH, Reid Ag, Wagner SD. Specific patterns of cromosomal gains and losses associate with t(3;14), t(8;14) and t(14;18) in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009;194:48-52.

- 7) Miller TP, Dahlberg S, Cassady JR, Adelstein DJ, Spier CM, Grogan TM, LeBlanc M, Carlin S, Chase E, Fisher RI. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate- and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 1998;339:21-6
- 8) Reyes F, Lepage E, Ganem G, Molina TJ, Brice P, Coiffier B, Morel P, Ferme C, Bosly A, Lederlin P, Laurent G, Tilly H; Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte(GELA). ACVBP versus CHOP plus radiotherapy for localized aggressive lymphoma. *N Engl J Med.* 2005;352:1197-205.
- 9) Persky DO, Unger JM, Spier CM, Stea B, LeBlanc M, McCarty MJ, Rimsza LM, Fisher RI, Miller TP; Southwest Oncology Group. Phase II study of rituximab plus three cycles of CHOP and involved-field radiotherapy for patients with limited-stage aggressive B-cell lymphoma: Southwest Oncology Group study 0014. *J Clin Oncol.* 2008;26:2258-63.
- 10) Pfreundschuh M, Trümper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, López-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M; MabThera International Trial Group. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2006;7:379-91.
- 11) Fabiani B, Delmer A, Lepage E, Guettier C, Petrella T, Brière J, Penny AM, Copin MC, Diebold J, Reyes F, Gaulard P, Molina TJ; Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. CD10 expression in

diffuse large B-cell lymphomas does not influence survival. *Virchows Arch.* 2004 Dec;445(6):545-51.

- 12) Marquard L, Poulsen CB, Gjerdrum LM, de Nully Brown P, Christensen IJ, Jensen PB, Sehested M, Johansen P, Ralfkiaer E. Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas. *Histopathology.* 2009;54:688-98.
- 13) Crump M, Coiffier B, Jacobsen ED, Sun L, Ricker JL, Xie H, Frankel SR, Randolph SS, Cheson BD. Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. *Ann Oncol.* 2008 May;19(5):964-9.
- 14) A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The international Non-Hodgkin' Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329: 987-994.
- 15) Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, Müller-Hermelink HK, Campo E, Braziel RM, Jaffe ES, Pan Z, Farinha P, Smith LM, Falini B, Banham AH, Rosenwald A, Staudt LM, Connors JM, Armitage JO, Chan WC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 2004;103:275-82.
- 16) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-511
- 17) Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-1947
- 18) Berglund M, Thunberg U, Amini RM, Book M, Roos G, Erlanson M, Linderöth J, Dictor M, Jerkeman M, Cavallin-Ståhl E, Sundström C, Rehn-Eriksson S, Backlin C, Hagberg H, Rosenquist R, Enblad G.

Evaluation of immunophenotype in diffuse large B-cell lymphoma and its impact on prognosis. *Mod Pathol.* 2005;18:1113-20.

- 19) Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Last KW, Norton A, Lister TA, Mesirov J, Neuberg DS, Lander ES, Aster JC, Golub TR. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2002;8:68-74.
- 20) O'Connor OA. Targeting histones and proteasomes: new strategies for the treatment of lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23:6429-6436.
- 21) Zeppa P, Marino G, Troncone G, Fulciniti F, De Renzo A, Picardi M, Benincasa G, Rotoli B, Vetrani A, Palombini L. Fine-needle cytology and flow cytometry immunophenotyping and subclassification of non-Hodgkin lymphoma: a critical review of 307 cases with technical suggestions. *Cancer.* 2004 Feb 25;102(1):55-65.
- 22) Laane E, Tani E, Björklund E, Elmberger G, Everaus H, Skoog L, Porwit-MacDonald A. Flow cytometric immunophenotyping including Bcl-2 detection on fine needle aspirates in the diagnosis of reactive lymphadenopathy and non-Hodgkin's lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;64:34-42.
- 23) Dey P. Role of ancillary techniques in diagnosing and subclassifying non-Hodgkin's lymphomas on fine needle aspiration cytology. *Cytopathology.* 2006;17:275-87. Review.
- 24) Anatomia patologica- Le Basi. Scarpa Aldo - Ruco Luigi. UTET,2008.