



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di *Scienze Chirurgiche, Oncologiche e Gastroenterologiche*

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA
XXVIII CICLO**

**RUOLO PROGNOSTICO DEI TUMOR ASSOCIATED MACROPHAGES E
DEL RAPPORTO LINFOCITI/MONOCITI SU SANGUE PERIFERICO ALLA
DIAGNOSI NEL LINFOMA DI HODGKIN**

Direttore della Scuola : Ch.ma Prof. PAOLA ZANOVELLO

Supervisore :Dott.ssa VITTORINA ZAGONEL

Dottorando : DARIO MARINO

Anno Accademico 2014-2015

A Savina Maria Luciana

INDICE

ABSTRACT	1
RIASSUNTO	8
1. INTRODUZIONE	16
1.1 Epidemiologia ed eziopatogenesi.....	16
1.2 Classificazione istopatologica.....	18
1.3 Clinica del linfoma di Hodgkin.....	21
1.4 Diagnosi e classificazione.....	23
1.5 Prognosi.....	27
1.6 Trattamento dei pazienti con linfoma di Hodgkin	29
1.7 Valutazione della risposta al trattamento.....	37
1.8 Complicanze a lungo termine.....	39
Complicanze neoplastiche.....	41
Complicanze non neoplastiche.....	44
2. SCOPO	48
3. MATERIALI E METODI.....	49
4. ANALISI STATISTICA.....	51
5. RISULTATI	52
5.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti e outcome.....	52
5.2 Valore prognostico di ALC, AMC e ALC/AMC.....	57
5.3 Valore prognostico di CD105 e CD68.....	60
6. DISCUSSIONE.....	64
7. CONCLUSIONI.....	69
8. BIBLIOGRAFIA.....	71
9. PUBBLICAZIONI.....	97

Abbreviazioni (in ordine alfabetico)

- **ALC:** Absolute Lymphocyte Count
- **AMC** Absolute Monocyte Count
- **ABVD:** Schema chemioterapico comprendente Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina
- **ASR:** Age-Standardized incidence Ratio
- **BEACOPP:** Schema chemioterapico comprendente Bleomicina, Etoposide, Adriamicina, Ciclofosfamide, Vincristina, Procarbazina, Prednisone
- **ECOG:** Eastern Cooperative Oncology Group
- **DFS:** Disease Free Survival
- **EFS:** Event Free Survival (sopravvivenza libera da eventi)
- **EORTC:** European Organization for Research and Treatment of Cancer
- **FFP:** Freedom From Progression (intervallo libero da progressione)
- **FFS:** Failure Free Survival (sopravvivenza libera da fallimento)
- **FFTF:** Freedom from Treatment Failure
- **GHSG:** German Hodgkin's Lymphoma Study Group
- **HCT:** Hematopoietic stem Cell Transplantation
- **HDC:** High Dose Chemoterapy
- **HR:** Hazard Ratio
- **IARC:** International Agency for Research on Cancer
- **LMR:** Lymphocyte/Monocyte Ratio
- **nLPHL:** (variante) a predominanza linfocitaria nodulare
- **IF-RT:** Involved Field Radiotherapy
- **IPS:** International Prognostic Score
- **HL (o LH):** Hodgkin Lymphoma (o linfoma di Hodgkin)
- **MOPP:** Schema chemioterapico comprendente Mecloretamina, Vincristina, Probarbazina, Prednisone
- **MVD:** Micro Vessel Density
- **OS:** Overall Survival (sopravvivenza globale)
- **PD:** Progression of Disease
- **PFS:** Progression Free survival
- **REAL:** Revised European-American Lymphoma Classification
- **R – S:** Reed – Sternberg cells
- **RC:** Remissione Completa
- **RP:** Remissione Parziale
- **RR:** Rischio Relativo
- **SC:** Stadio Clinico
- **SP:** Stadio Patologico
- **TAM:** Tumor Associated Macrophages
- **WHO:** World Health Organization

ABSTRACT

1.BACKGROUND

Hodgkin Lymphoma (HL) is a rare disease and it account for almost 5% of all malignant neoplasia and for 11% of lymphoma subtypes. Classical Hodgkin Lymphoma is hystologically characterized by the presence of giant multinucleated cells called Hodgkin cells and Reed-Sternberg cells: these are outnumbered respect to all cellular population in the neoplastic lymph node (about 1% to 5%) and are surrounded by a polymorphic reactive microenvironment constituted by lymphocytes, plasma cells, neutrophils, eosinophils, mast cells, macrophages, stromal cells and fibroblasts. Modern chemotherapy is able to cure about 80% of patients with Hodgkin Lymphoma. Because the disease occurs in young adulthood (age 15–35), there is a long life expectation so that the progressive improvement of cure rates must also taking into account the vital importance of long-term follow-up. Prognostic factors in patients include bulky mediastinal mass, B symptoms, more than 3 lymphatic stations involved and ESR > 50 mm/h. A multicentre study by Hasenclever et al. in 1998 identified seven prognostic factors for advanced stage HL (International Prognostic Score, IPS): age \geq 45, gender, albumin < 40 g/L, hemoglobin < 105 g/L, stage, leukocytosis \geq 15,000 per mm³, lymphopenia. An early response assessment as measured by an interim PET/computed tomography (PET/CT) scan has been shown to be a very powerful prognostic tool that is independent of clinical and biologic prognostic factors, including the IPS. However, currently, at least 20% of patients relapsed and a similar proportion is over treated. Interim PET has a clinical value only after ABVD treatment while IPS score is validated only for advanced stage. Some authors reported a prognostic impact of Tumour Associated Macrophages (TAM) and of absolute lymphocyte/monocyte ratio in peripheral blood in classical Hodgkin Lymphoma at diagnosis. These studies provide conflicting results and analysis are often based on not

homogeneous populations of patients. Here hence the need of new prognostic and predictive markers at diagnosis for better treatment of Hodgkin Lymphoma.

2.AIM OF THE STUDY

Aim of the study was the identification of new prognostic markers at diagnosis in Hodgkin lymphoma based on the value of absolute lymphocyte/monocyte ratio (LMR) in peripheral blood, TAM ratio and Microvessel Density (MVD) in neoplastic tissues obtained at diagnosis. Primary end point of the study was the prognostic value of LMR and TAM in term of Event Free Survival (EFS). We also correlated the stage of presentation at diagnosis divided into early (stage IA, IB, IIA without bulky lesions) and advanced (stage IIB, III, IV) with LMR, TAM and MVD.

3.MATERIALS AND METHODS

We considered all patient with new diagnosis of Hodgkin lymphoma treated at Istituto Oncologico Veneto from January 2004 to April 2015. We also analyzed all patients affected by HL treated in the same period at Oncology Department in Vittorio Veneto and Bassano del Grappa. All patients (n=143) have been evaluated for LMR while we performed immunohistochemical (IHC) analysis only in 60 samples excluding all cases with diagnostic specimen less than 1 cm. TAM percentage was determined by immunohistochemistry with a monoclonal antibody (anti-CD68). MVD was determined with anti CD105.

The relative percentage of CD68+ cells was established in relation to the overall cellularity: based on this value, patients were divided into three groups: <5% (low expression, score 1), 5–25% (intermediate expression, score 2) and >25% (high expression, score 3). Response to treatment was assessed with CT scan in the middle of treatment and with FDG-PET after

the completion of treatment. Patients treated according to ABVD regimen received an early evaluation with interim PET after 2 ABVD cycles

4. STATISTICAL ANALYSIS

Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to determine the optimal cut-off value of the LMR. The effect of variables on survivals was examined using the univariate analysis of Cox Proportional hazard model. Mann–Whitney test and logistic regression were used to correlate IHC analysis with progression/relapse observed and the stage of presentation at diagnosis. For survival analysis, primary endpoint was EFS, defined as the time from the first day of treatment until disease progression, relapse, death for any cause or last follow-up, Survival curves were estimated using the method of Kaplan and Meier. Statistical significance was defined as p value < 0,05. All statistical analyses were performed with SPSS Statistics 2.0 software.

5.RESULTS

The mean age at diagnosis was 38 years with 77 males and 66 females. Median follow up was 40 months (range 5-120). 126 patients received a diagnosis of classic Hodgkin's lymphoma, 95 of these (67%) had Nodular Sclerosis histological type, 20 (14%) Mixed cellularity , 11 (7%) Lymphocyte Depleted.. Finally, 17 (12%) patients were affected by Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma. 58 patients (41%) presented with limited-stage disease and 85 (59%) with advanced stage. 21 (15%) had bulky lesion. IPS was calculated for all the 85 patients in advanced stage: on the basis of this prognostic index, we recognized 15 patients (18%) with low-risk disease (IPS 0-1), 65 patients (76%) with intermediate risk disease (IPS 2-3) and 5 patients (6%) with high-risk

disease (IPS 4-7). 139 patients received chemotherapy with the following schemes: ABVD (in 106 cases), STANFORD V (in 23 cases), escalatedBEACOPP (in 8 cases) while two elderly patients considered frail at a multidimensional geriatric assessment received only palliation with procarbazine monotherapy. Four patients with Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma with stage IA received only radiation treatment. 86 of the 106 patients treated according to ABVD regimen, performed an evaluation through early interim PET after 2 cycles of therapy (PET 2). The survey provided a complete remission (CR) in 65 patients and a partial remission (PR) in 21 patients. Of the 65 patients with negative PET2, 8 relapsed (12%), while, among the 21 patients with positive PET 2, 11 showed relapse (52%), ten of the 21 patients with positive PET 2 achieved a complete remission after the end of treatment and are currently alive without evidence of disease. Our own experience confirms the important prognostic value of PET 2 after treatment according to ABVD scheme. 91 of 106 (85%) patients treated with the ABVD regimen experienced complete remission, 20 of 23 (87%) patients treated with STANFORD V was in complete remission after treatment. All patients (8 of 8) receiving escalatedBEACOPP are in complete remission. One patient developed acute myeloid leukemia one year after the end of treatment with escalatedBEACOPP regimen. 90 of the 143 patients underwent consolidation treatment with involved-field radiation therapy at a dose of 30 Gy or 36 Gy to the bulky lesions. A total of 123 patients presented complete remission after first-line therapy, 2 PR. 18 patients had disease progression at the end of the first-line treatment. 18 of the 123 patients in CR at the end of first-line therapy experienced relapse. 35 patients received a second-line therapy achieving complete remission in 23 cases. 11 patients died: in 8 cases the death occurred because of disease progression; in one patients the death is instead related to the development of a second cancer (acute myeloid leukemia after chemotherapy according to ABVD regimen with CR at the end of treatment for lymphoma); in two cases patients died after the occurrence of an acute myocardial infarction subsequent to

chemotherapy with ABVD. At a mean follow-up of 40 months, median EFS has not been reached. The average value of lymphocytes was 1,530 per mm³ with a median of 1350 per mm³ (range 330-9700). The average value of monocyte was of 720 per mm³ with a median of 610 per mm³ (range 70-2570). The lymphocyte/monocyte ratio had an average of 3.58. ROC curves were determined for the EFS in relation to Absolute Lymphocyte Count (ALC), Absolute Monocyte Count (AMC) and LMR. The area under the curve (AUC) for ALC had a value of 0.61 (95% CI, 0.468 to 0.752), for AMC was determined to be 0.512 (95% CI, 0.358 to 0.666), while for the ratio ALC / AMC was 0.558 (95% CI, 0.408 to 0.707). For none of these variables a statistically significant relationship with the EFS of patients was evidenced. We then correlated ALC, AMC and LMR with EFS using Cox Regression. Hazard ratio (HR) for ALC was 1.149 with p value of 0.464, for the AMC, HR was 1.103 with p value of 0.855. Finally for LMR, the HR was equal to 1,035 with p value of 0.086, not highlighting any statistically significant correlations. We also verified the presence of a possible association between the stage of disease presentation and ALC, AMC, LMR. From this, the lymphocyte/monocyte ratio appears to correlate with the stage of disease (p = 0.035). In particular the value of ALC / AMC in patients with advanced stage is lower (1.86) than the value observed in patients with limited stage (2,71). The Immunohistochemical analysis showed positivity for CD68 \leq 5% in 20 cases, between 5 and 25% in 26 cases and \leq 25% in 14 patients. As for the CD 105 we observed variability with an average of positivity of 15% (range 5% -30%). We evaluated the possible correlation between the positivity for CD68 and relapses/progressions, not experiencing difference among the three subgroups. Similarly, we tried to correlate the positivity for CD105 with recurrence/progression observed. Also in this case there were no statistically significant differences. Finally, we have verified the presence of a possible association between stage of disease, distinguished in limited and advanced, and the percentage of CD68 and CD105 detected in the diagnostic biopsy. Also in this case we have not found any statistically

significant correlation. No association between early FDG-PET and TAM or LMR was observed .

5.DISCUSSION

The study of Steidl in 2010 has opened a new perspective for risk stratification in patients with Hodgkin's lymphoma: starting from the evidence of the important role of macrophages in the process of interaction between tumor cells and the surrounding microenvironment, Steidl hypothesized the presence of a possible prognostic significance of the amount of CD68 + tumor-associated macrophages present in the neoplastic primitive lesion. Through a study of gene expression profiling performed on 130 biopsy specimens obtained at diagnosis in patients with classical Hodgkin lymphoma and then confirmed on an independent cohort of 166 patients, Steidl showed a strong association between increased expression of TAM and the reduction of progression-free survival (PFS) and Disease-Specific Survival (DSS). Following studies, however, have reported conflicting data. Our experience seems not to show any relationship between the macrophage infiltration and patient outcomes. TAM seem to have a fundamental role in tumor progression by modulating the immune system, angiogenesis and cell metastatization. Some studies have shown that macrophages produce VEGF-A, a growth factor for vascular endothelium, and matrix metalloproteinase 9 (MMP9), which facilitates the release of VEGF from the extracellular matrix thereby promoting angiogenesis. Literature data show that CD105 (Endoglin), an hypoxia-inducible protein and an integral part of the protein complex of the receptor for TGF- β , is abundantly expressed on endothelial cells of neovascularization of tumor tissues; also, the density of neovascularization in neoplastic tissues (MVD, Intratumoral microvessel density), determined using anti CD105, was identified to be an independent prognostic factor in

survival in some solid tumors and hematologic malignancies. Our study evaluated the presence of a possible association between the MVD and relapse / progression of the disease for the first time using the antibody antiCD105. Also in this case there were no statistically significant correlations.

Porrata et al. have linked the absolute lymphocyte count and the absolute monocyte count at diagnosis with the clinical outcome of patients with classic Hodgkin's lymphoma. This study showed that patients with an $AMC \geq 900$ cells /L have a lower survival than those with a lower level of monocytes in the peripheral blood; ALC has not only influence on overall survival (OS) and freedom from progression (FFP), as demonstrated by the study of Hasenclever, but also on progression free survival and lymphoma specific survival (LSS). A $LMR \geq 1.1$ is related to a higher OS, LSS, PFS and time to progression in all stages of the disease (both limited and advanced). Even in our work there is a statistically significant relationship between the ratio ALC / AMC and the presentation stage at diagnosis; there is no evidence, however, between ALC / AMC and EFS.

RIASSUNTO

1.INTRODUZIONE

Il Linfoma di Hodgkin (HL) è una malattia rara e rappresenta circa il 5% di tutte le neoplasie maligne e l'11% di tutti i linfomi. Il linfoma di Hodgkin classico è istologicamente caratterizzato dalla presenza di cellule giganti multinucleate chiamate cellule di Hodgkin e cellule di Reed-Sternberg, che rappresentano la minoranza rispetto a tutta la popolazione cellulare presente nel linfonodo (circa 1% a 5%) e sono circondate da un microambiente reattivo polimorfico costituito da linfociti, plasmacellule, neutrofili, eosinofili, mastociti, macrofagi, cellule stromali e fibroblasti. I trattamenti più moderni sono in grado di curare circa l'80% dei pazienti con linfoma di Hodgkin. Poiché la malattia si presenta nei giovani adulti (15-35 anni), c'è una lunga aspettativa di vita e quindi il progressivo incremento dei tassi di guarigione deve inoltre tener conto dell'importanza vitale di un lungo periodo di follow-up. I principali fattori prognostici includono: massa bulky mediastinica, sintomi B, più di 3 stazioni linfonodali coinvolte e VES > 50 mm / h. Uno studio multicentrico da Hasenclever et al. nel 1998 ha individuato sette fattori prognostici per la malattia in stadio avanzato (International Prognostic Score, IPS): età ≥ 45 , sesso maschile, albumina < 40 g / l, emoglobina < 105 g / l, stadio, leucocitosi ≥ 15.000 per mm^3 , linfopenia. Una valutazione precoce della risposta misurata da una PET intermedia ha dimostrato di essere un potente strumento prognostico indipendente da fattori clinici e biologici, compreso l'IPS. Tuttavia, attualmente, almeno il 20% dei pazienti recidiva e una percentuale simile viene sovra trattata. La interim PET ha un valore clinico solo dopo i trattamenti con schema ABVD mentre il punteggio IPS è valido solo per la malattia in fase avanzata.

Alcuni autori hanno segnalato un impatto prognostico dei Tumor Associated Macrophages (TAM) e del rapporto linfociti / monociti nel sangue periferico alla diagnosi nel Linfoma di Hodgkin Classico. Gli studi condotti fino ad ora forniscono risultati contrastanti e le analisi sono spesso basate su popolazione non omogenee di pazienti. Da qui la necessità di nuovi marcatori prognostici e predittivi alla diagnosi per un migliore trattamento della patologia.

2.SCOPO DELLO STUDIO

Obiettivo dello studio è stato l'identificazione di nuovi marcatori prognostici al momento della diagnosi di linfoma di Hodgkin in base al valore assoluto del rapporto linfociti / monociti (LMR) nel sangue periferico, la quantità di TAM e la micro vessel density (MVD) nel tessuto neoplastico ottenuti al momento della diagnosi. End-point primario dello studio era il valore prognostico di LMR e TAM in termini di sopravvivenza libera da eventi (EFS). Abbiamo anche correlato la fase di presentazione alla diagnosi suddivisa in precoce (stadio IA, IB, IIA senza lesioni bulky) e avanzata (stadio IIB, III, IV) con LMR, TAM e MVD.

3. MATERIALI E METODI

Abbiamo preso in considerazione tutti i pazienti con nuova diagnosi di linfoma di Hodgkin trattati presso l'Istituto Oncologico Veneto da gennaio 2004 ad aprile 2015. Abbiamo anche analizzato tutti i pazienti affetti da LH trattati nello stesso periodo presso il Dipartimento di Oncologia di Vittorio Veneto e Bassano del Grappa. Tutti i pazienti (n = 143) sono stati valutati per LMR mentre abbiamo effettuato le indagini immunoistochimiche (IHC) solo su 60 campioni escludendo tutti i casi con biopsie diagnostiche

inferiori a 1 cm. La percentuale di TAM è stata determinata mediante immunohistochimica con un anticorpo monoclonale anti-CD68 mentre la MVD è stata determinata con l'anticorpo antiCD105. La percentuale di cellule positive per CD68 è stata valutata in relazione alla cellularità generale: in base a questo valore, i pazienti sono stati divisi in tre gruppi: <5% (bassa espressione, score 1), 5-25% (espressione intermedia, p-score 2) e > 25% (alta espressione, score 3). La risposta al trattamento è stata valutata con TAC intermedia e PET al termine del trattamento. I pazienti trattati con schema ABVD ricevevano una rivalutazione precoce con l'esame PET dopo 2 cicli di cura.

4. ANALISI STATISTICA

Le curve ROC (Receiver Operating Characteristics) sono state utilizzate per determinare il cutoff ottimale di ALC (conta assoluta linfocitaria), AMC (conta assoluta monocitica) e LMR.

Il rapporto tra linfociti, monociti, ratio linfociti/monociti e EFS è stato valutato con un'analisi univariata mediante Regressione di Cox.

I risultati dell'analisi immunohistochimica sono stati correlati alle recidive/progressioni osservate e allo stadio di malattia, diviso in precoce e avanzato; per queste analisi sono stati utilizzati rispettivamente il Test di Mann-Whitney e la regressione logistica.

Valori di p inferiori a 0,05 sono considerati significativi.

Per l'analisi della sopravvivenza, endpoint primario era l'EFS, definito come il tempo dal primo giorno di trattamento fino alla progressione della malattia, recidiva, o morte per qualsiasi causa o data dell'ultimo follow-up

Le curve di sopravvivenza sono state calcolate con il metodo di Kaplan-Meier. La significatività statistica è stata definita come valore di $p < 0,05$. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il software SPSS Statistics 2.0.

5.RISULTATI

L'età media alla diagnosi era di 38 anni con 77 maschi e 66 femmine. Il follow up è stata di 40 mesi (range 5-120). 126 pazienti hanno ricevuto una diagnosi di linfoma di Hodgkin classico, 95 di questi (67%) avevano un istotipo a sclerosi nodulare, 20 (14%) a cellularità mista, 11 (7%) lymphocyte depleted. Infine, 17 (12%) pazienti erano affetti da linfoma di Hodgkin a prevalenza linfocitaria nodulare. 58 pazienti (41%) presentavano malattia in stadio limitato e 85 (59%), in stadio avanzato. 21 (15%) avevano lesioni bulky. L'IPS è stato calcolato per tutti gli 85 pazienti in stadio avanzato: in base a questo indice prognostico abbiamo individuato 15 pazienti (18%) con malattia a basso rischio (IPS 0-1) , 65 pazienti (76%) con malattia a rischio intermedio (IPS 2-3) e 5 pazienti (6%) con malattia ad alto rischio (IPS 4-7). 139 pazienti hanno ricevuto trattamento chemioterapico con i seguenti schemi: ABVD (in 106 casi), STANFORD V (in 23 casi), escalatedBEACOPP (in 8 casi), mentre due pazienti anziani considerati fragili ad una valutazione geriatrica multidimensionale hanno ricevuto solo trattamento palliativo con procarbazina in monoterapia. Quattro pazienti con Linfoma di Hodgkin a prevalenza linfocitaria nodulare in stadio IA hanno ricevuto solo trattamento radiante. 86 dei 106 pazienti trattati secondo schema ABVD, hanno eseguito una rivalutazione attraverso PET dopo 2 cicli di terapia (PET 2). L'indagine ha fornito una remissione completa (CR) in 65 pazienti e una remissione parziale (PR) in 21 pazienti. Dei 65 pazienti con PET2 negativa , 8 hanno presentato in seguito una recidiva (12%), mentre, tra i 21 pazienti con PET 2 positiva , 11 hanno mostrato recidiva (52%), dieci dei 21 pazienti con PET 2 negativa hanno ottenuto una remissione completa dopo la fine del trattamento e sono attualmente vivi e senza evidenza di malattia. La nostra esperienza

conferma l'importante valore prognostico della PET 2 dopo il trattamento secondo schema ABVD.

91 su 106 (85%) pazienti trattati con il regime ABVD hanno presentato recidiva o progressione di malattia, 20 dei 23 (87%) pazienti trattati con STANFORD V hanno avuto recidiva di malattia mentre tutti i pazienti (8 su 8) trattati con lo schema escalatedBEACOPP hanno ottenuto remissione completa. Un paziente ha sviluppato leucemia mieloide acuta un anno dopo la fine del trattamento con escalatedBEACOPP. 90 su 143 pazienti hanno ricevuto un trattamento di consolidamento con radioterapia involved-field alla dose di 30 Gy o 36 Gy sulle lesioni bulky. In totale 123 pazienti hanno avuto un quadro di remissione completa al termine della terapia di prima linea, 2 remissione parziale e 18 sono progrediti alla fine del trattamento di prima linea. 18 dei 123 pazienti in CR alla fine della terapia di prima linea hanno sperimentato recidiva. 35 pazienti hanno ricevuto una terapia di seconda linea ottenendo una remissione completa in 23 casi. 11 pazienti sono morti: in 8 casi la morte si è verificata a causa della progressione della malattia; in un caso la morte è invece correlata allo sviluppo di un secondo tumore (leucemia mieloide acuta dopo chemioterapia secondo schema ABVD con RC alla fine del trattamento per linfoma); in due casi i pazienti sono morti per infarto miocardico acuto successivo a chemioterapia con schema ABVD. Ad un follow-up medio di 40 mesi, non è stata raggiunta la EFS mediana. Il valore medio dei linfociti era 1.530 per mm³ con una mediana di 1350 per mm³ (range 330-9700). Il valore medio di monociti è stato di 720 per mm³ con una mediana di 610 per mm³ (range 70-2570). Il rapporto linfociti / monociti medio è stato di 3,58. Sono state eseguite le curve ROC per l' EFS in relazione alla conta assoluta dei linfociti (ALC), alla conta assoluta dei monociti (AMC) e al LMR. L'area sotto la curva (AUC) per ALC aveva un valore di 0,61 (95% CI, 0,468 a 0,752), per AMC è risultata di 0,512 (95% CI, 0,358 a 0,666), mentre per il rapporto ALC / AMC era 0,558 (95% CI, 0,408-0,707). Per nessuna di queste variabili è stata evidenziata una relazione statisticamente significativa con l'EFS dei

pazienti. Abbiamo poi correlato ALC, AMC e LMR con EFS utilizzando la regressione di Cox. L'Hazard ratio (HR) per ALC era 1.149 con un valore p di 0,464, per AMC, HR era 1.103 con un valore p di 0,855. Infine per LMR, HR era uguale a 1.035 con un valore p di 0,086, non evidenziando correlazioni statisticamente significative. Abbiamo anche verificato la presenza di una possibile associazione tra la fase di presentazione della malattia e ALC, AMC, LMR. Da questo, il rapporto linfociti / monociti sembra essere correlato con lo stadio di presentazione alla diagnosi ($p = 0,035$). In particolare il valore di ALC / AMC in pazienti con stadio avanzato è più basso (1,86) rispetto al valore osservato nei pazienti con stadio limitato (2,71). L'analisi immunohistochimica ha mostrato positività per CD68 $\leq 5\%$ in 20 casi, tra il 5 e il 25% in 26 casi e $\leq 25\%$ in 14 pazienti. Per la positività al CD 105 abbiamo osservato una maggiore variabilità con una media di positività del 15% (range 5% -30%). Abbiamo valutato la possibile correlazione tra la positività per CD68 e le recidive / progressioni osservate, non evidenziando nessuna differenza fra i tre sottogruppi. Allo stesso modo, si è cercato di correlare la positività per CD105 con le recidive / progressioni. Anche in questo caso non vi sono state differenze statisticamente significative. Infine, abbiamo verificato la presenza di una possibile associazione tra lo stadio della malattia, distinto in limitata e avanzata, e la percentuale di CD68 e CD105 rilevato nella biopsia diagnostica. Anche in questo caso non abbiamo trovato alcuna correlazione statisticamente significativa. Non sono state evidenziate associazioni tra lo stato della PET 2 e la percentuale di TAM e il LMR riscontrati.

5.DISCUSSIONE

Lo studio di Steidl del 2010 ha aperto una nuova prospettiva per la stratificazione del rischio nei pazienti con linfoma di Hodgkin: a partire dall'evidenza del ruolo importante dei macrofagi nel processo di interazione tra le cellule tumorali e il microambiente circostante, Steidl ha ipotizzato la presenza di un possibile significato prognostico della quantità dei macrofagi CD68 + presenti nella lesione neoplastica primitiva. Attraverso lo studio dei profili di espressione genica eseguiti su campioni bioptici di 130 pazienti affetti da linfoma di Hodgkin ottenuti al momento della diagnosi e poi confermati in una coorte indipendente di 166 pazienti, Steidl ha mostrato una forte associazione tra l'aumentata espressione di TAM con la riduzione della sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza malattia-specifica (DSS). Studi successivi tuttavia, hanno riportato dati contrastanti. La nostra esperienza non sembra mostrare alcun rapporto tra l'infiltrazione di macrofagi e l'outcome dei pazienti. I TAM sembrano avere un ruolo fondamentale nella progressione tumorale modulando il sistema immunitario, l'angiogenesi e la metastatizzazione cellulare. Alcuni studi hanno dimostrato che i macrofagi producono VEGF-A, un fattore di crescita per l'endotelio vascolare, e metalloproteinasi della matrice 9 (MMP9), che facilita il rilascio di VEGF dalla matrice extracellulare promuovendo così l'angiogenesi. Dati di letteratura indicano che CD105 (Endogлина), una proteina indotta dall'ipossia e parte integrante del complesso proteico del recettore per TGF- β , è abbondantemente espressa sulle cellule endoteliali dei neovasi dei tessuti tumorali; anche, la densità dei vasi neoformati nei tessuti neoplastici (MVD, intratumorale densità dei microvasi), determinata utilizzando l'anticorpo anti- CD105, è stata identificata come un fattore prognostico indipendente per la sopravvivenza in alcuni tumori solidi e neoplasie ematologiche. Il nostro studio ha valutato per la prima volta la presenza di una possibile associazione tra l'MVD e la recidiva / progressione della malattia

utilizzando l'anticorpo anti CD105. Anche in questo caso non vi erano correlazioni statisticamente significative. Porrata et al. hanno collegato la conta linfocitaria assoluta e la conta dei monociti alla diagnosi con l'outcome clinico dei pazienti con linfoma di Hodgkin.. Questo studio ha dimostrato che i pazienti con un AMC \geq 900 cellule / L hanno una sopravvivenza inferiore rispetto a quelli con un basso livello di monociti del sangue periferico; ALC ha influenza non solo sulla sopravvivenza globale (OS) e libera da progressione (FFP), come dimostrato dallo studio di Hasenclever, ma anche sulla sopravvivenza specifica per linfoma (LSS). Un LMR \geq 1.1 si associa ad una maggiore OS, LSS, PFS e tempo alla progressione in tutti gli stadi della malattia (sia limitato che avanzato). Anche nel nostro lavoro vi è una relazione statisticamente significativa tra il rapporto ALC / AMC e la fase di presentazione al momento della diagnosi; non ci sono relazioni statisticamente significative, tuttavia, tra ALC / AMC e EFS.

1. INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia ed eziopatogenesi

Il linfoma di Hodgkin è una neoplasia linfoproliferativa dotata di caratteristiche molecolari, istologiche, immunofenotipiche e cliniche del tutto peculiari.

Rappresenta l'11% di tutti i linfomi maligni e poco più dello 0.5% di tutte le forme di neoplasia diagnosticate nei Paesi occidentali¹ con una incidenza in Europa pari a 2-3 casi/100000 e una mortalità pari a 0,4 casi/100000 persone all'anno.

L'incidenza del linfoma di Hodgkin varia significativamente in base a diversi fattori, quali età, sesso, etnia, localizzazione geografica e stato socio economico. E' descritta una distribuzione bimodale della malattia con un'incidenza che aumenta dopo il 10° anno, ha un picco alla fine della seconda decade e quindi si abbassa fino all'età di 40-45 anni per poi tornare ad aumentare progressivamente²⁻⁴ (Fig. 1).

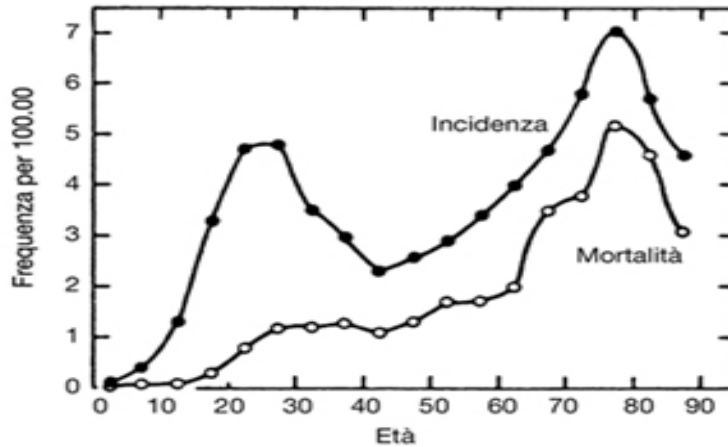


Figura 1. Incidenza e mortalità nei pazienti con linfoma di Hodgkin in rapporto ai gruppi di età.

Descritta per la prima volta nel 1666 da Malpighi, studiata dettagliatamente solo da Thomas Hodgkin nel 1832 in Inghilterra, dopo più di 150 anni dalla sua scoperta e nonostante la sua elevata percentuale di guarigione, la sua eziopatogenesi è ancora sconosciuta. Il quadro biologico corrisponderebbe a quello di un disturbo cronico del sistema immunitario, in cui uno stimolo mitogeno ripetuto può sia indurre riarrangiamenti genici di tipo clonale e cromosomici di tipo strutturale (l'anomalia più frequente è la delezione 4q localizzata a livello della regione 4q25 - 4q28), sia promuovere la crescita di cellule giganti, dette di Reed-Sternberg ². Alla base potrebbero esserci diversi eventi patologici tra i quali infezioni virali, agenti ambientali e reazioni geneticamente determinate dell'ospite.

Diversi studi di coorte hanno rilevato alcuni importanti dati a favore di un processo infettivo EBV correlato:

a) un maggior rischio (circa 2-3 volte superiore) di sviluppare la malattia nei pazienti con anamnesi positiva per la mononucleosi infettiva ⁵;

b) un'alta percentuale di casi di linfoma in cui sono presenti titoli elevati di anticorpi IgG contro l'antigene virale capsidico dell'Epstein - Barr virus;

c) il dosaggio di elevati titoli di anticorpi anti-EBV molti anni prima della manifestazione clinica del linfoma, a indicare quindi una prolungata attività virale pre – diagnosi ⁶;

d) il riscontro nel 20-40% dei pazienti nei Paesi industrializzati e nel 70% nei Paesi sottosviluppati (Africa, Asia e America latina) di parti del genoma dell'EBV (acidi nucleici o proteine) all'interno delle cellule Reed-Sternberg ^{7,8}.

Il genoma dell'EBV è stato trovato all'interno delle cellule di Reed-Sternberg nel 20-40% dei casi di Hodgkin con una precedente diagnosi di mononucleosi infettiva ^{9,10} e in circa il 30-40% dei pazienti giovani adulti ⁸. Recenti dati epidemiologici dimostrano un aumento di incidenza di linfomi di Hodgkin EBV+ in pazienti HIV positivi trattati con moderne terapie antiretrovirali ^{11, 12}.

Vi sono inoltre evidenze di un contributo genetico nell'eziologia di questa malattia: la suscettibilità genetica e l'aggregazione familiare sembrano infatti svolgere un ruolo importante nel linfoma di Hodgkin. Mack e collaboratori hanno dimostrato una forte evidenza di suscettibilità genetica osservando un rischio di malattia superiore nei gemelli omozigoti ¹³. Dati più recenti mostrano come l'assetto HLA sia implicato nella patogenesi del linfoma di Hodgkin EBV+, in particolare HLA A-02 sembra essere associato ad un minor rischio mentre HLA A-01 ad un rischio aumentato di malattia ¹⁴. Questi dati rafforzano l'ipotesi che il linfoma di Hodgkin sia il risultato di una risposta immune geneticamente determinata ad un patogeno ambientale.

1.2 Classificazione istopatologica

Nel corso degli anni la classificazione istologica del linfoma di Hodgkin ha subito diverse modificazioni. Si è passati dalla classificazione di Jackson e Parker , a quella di Lukes, Butler e Hicks, di Rye del 1965 fino alle

classificazioni REAL e WHO 2008, oggi giorno considerate le più importanti e valide (Tab.1).

Tabella I. Classificazione del linfoma di Hodgkin.

Classificazione REAL	Classificazione WHO
Predominanza linfocitaria nodulare	Predominanza linfocitaria nodulare (con o senza aree diffuse)
Linfoma di Hodgkin classico: <ul style="list-style-type: none"> • LH lymphocyte-rich • Sclerosi nodulare • Cellularità mista • Deplezione linfocitaria 	Linfoma di Hodgkin classico <ul style="list-style-type: none"> • Sclerosi nodulare • Varietà ricca in linfociti • Cellularità mista • Deplezione linfocitaria

Sulla base di quest'ultima classificazione (WHO 2008) si distinguono il linfoma di Hodgkin classico (comprendente i quattro sottotipi: Sclerosi nodulare, il più frequente osservato in circa il 40% dei casi), Cellularità mista, Deplezione linfocitaria e Varietà ricca in linfociti) e il linfoma di Hodgkin a predominanza linfocitaria nodulare. La variante a prevalenza linfocitaria differisce dalla forma classica in termini di morfologia, fenotipo, genotipo e comportamento clinico, più simile a un linfoma non Hodgkin follicolare. Essa rappresenta il 4 - 5% di tutti i casi e può evolvere in un linfoma a grandi cellule di tipo B^{15,16}.

Dal punto di vista istologico il linfoma di Hodgkin classico è caratterizzato dalla presenza di cellule neoplastiche giganti chiamate cellule di Hodgkin e Reed-Sternberg (H-RS) le quali risultano essere la minoranza della popolazione cellulare totale del tessuto affetto (dall'1 al 5% circa) e sono circondate da un numero variabile di cellule non clonali reattive costituite da linfociti, plasmacellule, granulociti eosinofili e macrofagi.

L'origine cellulare delle cellule H-RS è stata per lungo tempo ignota a causa della scarsità di queste cellule nei tessuti affetti, che ne limitava l'analisi molecolare. Queste cellule presentano inoltre un immunofenotipo

atipico: oltre alla comune positività per CD 30 (un fattore di necrosi tumorale di cui non si conosce l'origine cellulare), le cellule H-RS presentano contemporaneamente l'espressione di marker di differenti linee cellulari (fascine e TARC tipici delle cellule dendritiche, CD 15 tipico di granulociti e monociti, Pax-5 comune nelle cellule B, MUM1 e CD138 tipiche delle plasmacellule) che hanno reso difficoltosa l'identificazione dell'origine cellulare ^{17,18}. Conclusioni più certe sono state stabilite quando è stato possibile microdissezionare la singola cellula neoplastica da sezioni di tessuto affetto ed analizzarla per il riarrangiamento delle regioni variabili delle immunoglobuline: tale riarrangiamento è stato trovato in quasi tutti i casi di cHL, portando così alla conclusione che queste cellule derivino da cellule B mature ¹⁹⁻²¹.

Per quanto riguarda la variante a predominanza linfocitaria nodulare (nLPHL) le cellule neoplastiche mostrano un immunofenotipo tipico delle cellule B con espressione di CD20, CD79a, Pax5, Oct2, Bob1, e Ig, quest'ultima documentata sia a livello di RNA che a livello di proteine ^{18,22,23}; inoltre esprimono un fattore di trascrizione specifico delle cellule B del centro germinativo, il Bcl6 ^{24,25}.

Un segno tipico delle cellule H-RS è l'attivazione costitutiva del fattore di trascrizione NF-κB: questo è in parte dovuto ai segnali che si instaurano tra i membri della famiglia TNF (CD40, CD30) come risultato di una complessa comunicazione con i linfociti che circondano il tumore. Inoltre nel 40% dei casi di cHL, le cellule H-RS sono infettate da EBV: probabilmente la proteina di membrana latente LMP1 funziona in queste cellule come un oncogene attivando il fattore NF-κB, contribuendo così alla patogenesi della malattia ²⁶. Infine la presenza di mutazioni a livello di alcune vie di segnale, quale quella del CD95, contribuisce alla resistenza all'apoptosi delle cellule H-RS ²⁷.

Le cellule H-RS rappresentano soltanto una minoranza della popolazione cellulare dei tessuti affetti; prevale, infatti, in questi un infiltrato simil-infiammatorio composto da linfociti, macrofagi, eosinofili, plasmacellule, cellule stromali e fibroblasti reclutati da citochine e chemochine espresse

dalle stesse cellule H-RS ^{26, 28}. Le cellule infiammatorie supportano le cellule H-RS, richiamano cellule addizionali e stimolano la sintesi di collagene. La frequenza dei vari tipi cellulari varia sulla base dei quattro sottotipi di cHL, e nella maggior parte dei casi si tratta di linfociti CD4+ Th2 a prevalere: si è nel tempo capito che questi linfociti T hanno attività regolatoria (CD4⁺CD25^{high} FOXP3⁺ regulatory T cells) in quanto sopprimono un'appropriata risposta immune nei tessuti affetti e proteggono le cellule H-RS dall'attacco immunologico dei linfociti T citotossici ^{29,30}

1.3 Clinica del linfoma di Hodgkin

Il linfoma di Hodgkin si presenta tipicamente con un'adenopatia sopradiaframmatica che necessita di biopsia escissionale per la diagnosi di certezza. I linfonodi della porzione inferiore del collo (soprattutto a sinistra) e quelli sopraclavicolari sono i siti più comunemente interessati. Si può presentare anche sotto forma di massa mediastinica, la quale compare anteriormente all'aorta ascendente ed entra in diagnosi differenziale con timomi e patologie tiroidee. Solo il 10% dei pazienti presenta una malattia iniziale sottodiaframmatica.

I linfonodi patologici si presentano indolenti e di consistenza parenchimatosa, con la peculiarità di diventare rapidamente dolenti dopo l'assunzione di alcool.

Nella maggior parte dei casi sono le linfoadenopatie a portare il paziente all'attenzione clinica, anche se non sono infrequenti sintomi quali: tosse secca, senso di compressione toracica, e addirittura dispnea nel caso di masse mediastiniche maggiori di 10 cm di diametro.

In circa il 30% dei pazienti affetti dal linfoma di Hodgkin si presentano quelli che vengono riconosciuti come sintomi "B", in assenza di adenopatie periferiche:

-sudorazioni notturne profuse,

- perdita di peso inspiegabile superiore al 10% negli ultimi sei mesi,
- febbre >38°C (soprattutto serotina).

Un'altra presentazione tipica è la comparsa di prurito non correlabile ad alcuna causa fisica, che deve spingere il paziente ad un attento esame clinico, soprattutto nel caso di pazienti giovani.

La presentazione clinica del linfoma di Hodgkin è correlata al sottotipo istologico, al genere e all'età del paziente:

- il sottotipo sclerosi nodulare, il più frequente, si può presentare come malattia limitata od estesa, con interessamento mediastinico in circa il 75% dei casi;
- i pazienti più anziani o immunodeficienti presentano più frequentemente sintomi B, malattia avanzata e un'istologia di tipo cellularità mista;
- la variante a predominanza linfocitaria nodulare prevale nel sesso maschile e generalmente interessa i linfonodi sopra o sottodiaframatici risparmiando il mediastino. I pazienti affetti da questa variante sono asintomatici nella quasi totalità dei casi e generalmente hanno una malattia confinata ad una singola regione linfonodale.

L'interessamento midollare da parte del linfoma può presentarsi clinicamente sotto forma di sintomatologia dolorosa e raramente determina citopenia³¹.

Il linfoma può presentarsi nel 15-30% dei casi con un interessamento extranodale³². Tra i siti più frequentemente colpiti si hanno:

- milza: interessata nel 30-40% dei casi già al momento della diagnosi;
- fegato: raramente interessato all'esordio, colpito per lo più secondariamente. Le lesioni epatiche si associano quasi invariabilmente a lesioni spleniche;
- polmoni: interessati nel 6-12% dei casi, solitamente in associazione ad un interessamento mediastinico;
- pleura: interessata nel 13% dei casi già al momento della diagnosi;
- timo: colpito nel 30-56% dei casi con interessamento mediastinico;

-scheletro: l'interessamento scheletrico è presente solo nell' 1-4% dei casi alla diagnosi. Le lesioni scheletriche interessano tipicamente le vertebre dorsali, lombari e il bacino, e si presentano sotto forma di aree di osteolisi.

1.4 Diagnosi e classificazione

Gli elementi essenziali per la diagnosi di linfoma di Hodgkin si possono così riassumere:

- linfadenomegalia, unica o multipla, non dolente, frequentemente monostazionale e con dimensioni variabili nel tempo;
- presenza di uno o più segni sistemici (febbre, sudorazione notturna, perdita di peso);
- cellule di Reed-Sternberg (R-S) nella biopsia del tessuto neoplastico.

La diagnosi di linfoma di Hodgkin è squisitamente anatomo-patologica e la *biopsia linfonodale escissionale* rappresenta l'esame diagnostico insostituibile, o in alternativa la biopsia di un altro organo che si sospetti essere affetto. Una volta identificata la malattia è necessario valutarne l'estensione anatomica (stadiazione) attraverso una serie di esami radiologici, biochimici ed ematologici: il workup diagnostico dovrebbe includere un'attenta valutazione anamnestica e obiettiva che deve ricercare l'eventuale presenza di sintomi B (sudorazioni notturne profuse, perdita di peso inspiegabile superiore al 10% negli ultimi sei mesi, febbre >38°C), l'intolleranza all'alcool, il prurito, la "fatigue", il performance status, e l'esame obiettivo delle varie stazioni linfonodali, del fegato e della milza; i test standard di laboratorio (emocromo con formula, biochimica, piastrine, VES, LDH, albumina, e i test di funzionalità epatica e renale); test di screening per HIV, HBV ed HCV; radiografia del torace; PET/CT; e TC con e senza mezzo di contrasto.

Rispetto alla TAC, la PET sembra avere una sensibilità maggiore (88 vs 74%), alla quale si associa anche una specificità molto elevata. La ripetizione precoce di questo esame durante l'esecuzione del trattamento

chemioterapico secondo schema ABVD, in genere dopo due cicli (PET 2), fornisce informazioni molto utili dal punto di vista prognostico, soprattutto negli Hodgkin avanzati. A due anni la sopravvivenza libera da progressione (PFS) passa dal 12.8% nei casi PET-2 positivi al 95% in quelli con PET-2 negativi con una sensibilità, specificità e accuratezza rispettivamente dell' 81%, 97% e 92%^{33,34}.

Prima dell'inizio del trattamento è inoltre opportuno valutare la funzionalità cardiaca con ECG ed ecocardiografia per valutare la frazione di eiezione (soprattutto nel caso in cui il paziente venga sottoposto a chemioterapia a base di Doxorubicina). I test di funzionalità polmonare, che includono il test di capacità di diffusione del monossido di carbonio (DLCO), sono raccomandati per quei pazienti che devono essere sottoposti a chemioterapia a base di Bleomicina. Sono infine raccomandati i vaccini contro i batteri capsulati (*H. influenzae*, pneumococco e meningococco) per quei pazienti per cui è prevista la radioterapia a livello splenico. Per le donne in età fertile dovrebbe essere inoltre eseguito un test di gravidanza prima dell'inizio delle chemioterapie. Le chemioterapie con agenti alchilanti sono associate ad un maggior rischio di sterilità³⁵, è per questo consigliabile informare i pazienti del rischio e presentare loro la possibilità di criopreservazione di liquido seminale ed ovociti.

Il sistema di stadiazione attualmente utilizzato si basa sulla classificazione in quattro stadi di Cotswolds (1989) (Tab.II), che rappresenta un aggiornamento di quella accettata internazionalmente ad Ann Arbor nel 1971, il cui merito principale fu di assegnare ai siti di malattia extranodale, prossimali e contigui, il suffisso "E", includendoli poi nel campo di irradiazione, e introdurre il concetto di *stadio patologico* (SP), consistente nell'esplorazione laparotomica dell'addome con splenectomia obbligatoria e biopsie multiple epatiche e linfonodali, oltre che in ogni altra lesione sospetta. Ad esso si affiancava il cosiddetto *stadio clinico* (SC) comprendente, oltre alla biopsia diagnostica, l'anamnesi, l'esame obiettivo, gli esami di laboratorio e quelli radiografici³⁶.

Attualmente l'esame PET e TAC eseguiti alla stadiazione non rendono più

necessaria l'esecuzione della laparoscopia diagnostica. Dati più recenti hanno dimostrato come non sia necessaria l'esecuzione della biopsia ossea negli stadi precoci di malattia qualora la stadiazione venga eseguita mediante esame PET³⁷.

Tabella II. Classificazione in stadi secondo Cotswolds

<i>Stadio I</i>	Interessamento di una singola regione linfonodale o struttura linfoide (ad es., milza, timo, anello di Waldeyer)
<i>Stadio II</i>	Interessamento di due o più regioni linfonodali dallo stesso lato del diaframma (il mediastino costituisce una singola sede, i linfonodi ilari un'altra sede).
<i>Stadio III</i>	Interessamento di regioni o strutture linfonodali da entrambi i lati del diaframma Interessamento di una o più sedi extralinfonodali la cui compromissione supera quella designata come "E"
<i>Stadio IV</i>	Interessamento di una o più sedi extralinfonodali la cui compromissione supera quella designata come "E"
"A"	Assenza di segni sistemici
"B"	Presenza di segni sistemici (febbre > 38 °C, sudorazione prevalentemente notturna, perdita di peso corporeo > 10% nei 6 mesi precedenti la diagnosi istologica)
"X"	Adenopatia massiva ("bulky") <ul style="list-style-type: none"> • allargamento del mediastino > 1/3 • massa linfonodale > 10 cm
"E"	Interessamento di una singola struttura extralinfonodale ma contigua o prossimale a una nota sede linfonodale

Dopo il completamento della stadiazione i pazienti possono essere collocati in tre categorie (Tabella III):

-stadio limitato,

-stadio intermedio,

-stadio avanzato,

sulla base dei quali verranno sottoposti ad un diverso schema terapeutico .

Tabella III. Definizione dei gruppi di rischio secondo EORTC, LYSA e GHLSG

Gruppo di Trattamento	EORTC/LYSA	GHLSG
Stadio limitato	SC I–II senza fattori di rischio (sopra-diaframmatico)	SC I–II senza fattori di rischio
Stadio Intermedio	SC I–II con ≥ 1 fattore di rischio (sopra-diaframmatico)	SC I, SC IIA con ≥ 1 fattore di rischio; □ SC IIB con fattori di rischio C/D, ma non A/B
Stadio avanzato	SC III–IV	SC IIB con fattori di rischio A/B, SC III/IV
Fattori di rischio	(A) massa mediastinica $> 1/3$ del diametro trasverso interno del torace a livello di T5-T6 su una radiografia antero-posteriore (B) Età ≥ 50 anni (C) VES > 50 se A, > 30 se B (D) > 3 aree nodali	(A) massa mediastinica $> 1/3$ del diametro trasverso interno del torace a livello di T5-T6 su una radiografia antero-posteriore (B) VES > 50 o sintomi Belevata (C) > 3 aree nodali (D) lesione > 10 cm

Sintomi B: febbre, sudorazioni notturne, perdita di peso $> 10\%$ negli ultimi 6 mesi. LYSA: Lymphoma Study Association; GHSG: German Hodgkin Study Group; SC: stadio clinico; VES: velocità di eritrosedimentazione.

(Eichenauer, ESMO Clinical Practice Guidelines, Luglio 2014)

1.5 Prognosi

In pazienti con malattia in stadio precoce (I e II), sono stati identificati dei fattori di rischio: uno di questi è la presenza di una massa mediastinica di tipo bulky, intendendo con questo termine ogni singolo linfonodo o pacchetto linfonodale con diametro maggiore od uguale a 10 cm.³⁶ Altri fattori prognostici sfavorevoli per i pazienti con stadio I e II includono: sintomi di tipo B, più di 3 siti linfonodali coinvolti dalla malattia, una VES superiore a 50 mm/h. Questi fattori si basano sulla definizione di fattori prognostici negativi data da EORTC, German Hodgkin Study Group (GHSG), e National Cancer Institute of Canada (NCIC). Un altro importante fattore prognostico è sicuramente l'età: i pazienti più anziani hanno generalmente malattia biologicamente resistente alla terapia e sono meno tolleranti nei confronti di chemioterapie aggressive. La possibilità di cura per questi pazienti si riduce di circa la metà rispetto ai pazienti più giovani. Uno studio multicentrico del 1998 pubblicato da Dhiel V. e Hasenclever ha inoltre identificato e ampiamente validato alcuni fattori prognostici aggiuntivi per gli stadi avanzati (Tab IV). Questi fattori, tre clinici e quattro laboratoristici, vengono riconosciuti sotto il nome di International Prognostic Score (IPS)³⁸⁻⁴¹.

Tabella IV. International Prognostic Score

<p>International Prognostic Score (IPS): 1 punto per ogni voce (malattia avanzata)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Albumina < 4 g/dL • Emoglobina < 10.5 g/dL • Sesso Maschile • Età \geq 45 anni • Stadio IV • Leucocitosi (almeno Globuli Bianchi 15,000/mm³) • Linfocitopenia (conta linfocitaria inferiore all' 8% dei globuli bianchi totali, e/o linfociti inferiori a 600/mm³)
--

Ai pazienti viene così assegnato uno score che va da 0 a 7, e la malattia può essere categorizzata come a basso (0-1), intermedio (2-3) o alto (4-7) rischio. La freedom from progression (FFP) si riduce di circa il 7% a cinque anni per ogni fattore presente.

Alcuni studi hanno tuttavia dimostrato la superiorità dell'FDG-PET rispetto all'IPS nel predire la FFP dei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin in stadio avanzato trattati secondo schema ABVD.

Gallamini et al. nel 2007³³ hanno valutato una casistica di 260 pazienti affetti da linfoma di Hodgkin in stadio avanzato sottoposti a rivalutazione precoce mediante PET dopo 2 cicli di trattamento con schema ABVD. Tra i pazienti con PET positiva, l'87% presentava progressione a due anni contro il 5% dei pazienti con PET negativa indipendentemente dal punteggio IPS.

Sono in corso trial volti a modulare l'intensità del trattamento chemioterapico in base alla risposta della interimPET con l'obiettivo da un lato, di mantenere l'efficacia delle terapie, dall'altro di ridurre l'incidenza di eventi avversi tardivi.

1.6 Trattamento dei pazienti con linfoma di Hodgkin

Radioterapia

La radioterapia è stata la prima modalità di trattamento offerta ai pazienti con linfoma di Hodgkin e per decenni fu usata da sola. Il suo ruolo è poi drasticamente cambiato in seguito all'avvento della chemioterapia e ad una maggiore attenzione posta agli effetti indesiderati a lungo termine associati al trattamento radioterapico stesso. Ciò ha comportato un utilizzo meno estensivo, in associazione alla chemioterapia, con notevoli cambiamenti anche nei campi di irradiazione, dosi e tecniche adottate^{42,43}. Attualmente, nella maggior parte dei pazienti con Linfoma di Hodgkin, la radioterapia viene usata come consolidamento dopo chemioterapia; tuttavia per alcuni pazienti, in particolar modo per quelli con la variante a prevalenza linfocitaria nodulare in stadio precoce e i linfomi di Hodgkin classici con controindicazioni alla chemioterapia, rappresenta il trattamento d'elezione⁴⁴.

Il principio base del trattamento radioterapico è quello di irradiare tutti i linfonodi interessati dal linfoma e le aree nodali ed extranodali a rischio di un coinvolgimento subclinico; per evitare una tossicità eccessiva, i campi di irradiazione vengono trattati sequenzialmente, la dose frazionata e gli organi a rischio protetti con dei blocchi schermanti⁴⁴.

In passato i campi di irradiazione comprendevano sia le stazioni linfonodali coinvolte sia quelle anatomicamente e funzionalmente adiacenti, ma non interessate dalla malattia, ed erano definiti "large fields"⁴⁴⁻⁴⁶. Attualmente questi campi vengono usati sempre più raramente in seguito all'introduzione dell'involved field (limitato a stazioni linfonodali clinicamente coinvolte o all'area extralinfonodale affetta).

In alternativa all'IFRT può essere utilizzata l'involved nodal" RT che si limita ad irradiare i linfonodi originalmente coinvolti e le possibili estensioni extranodali con un campo più piccolo rispetto a quello usato nell'IFRT. Il trattamento con IFRT e "involved nodal" RT necessita dell'utilizzo delle moderne TC per definire il campo. L'entità delle radiazioni utilizzate per il trattamento è andata nel tempo riducendosi: vengono raccomandate dosi di 30-36 Gy se combinata ad ABVD e di 36 Gy se combinata a Stanford V nel trattamento di malattie bulky (qualsiasi sia lo stadio), nel caso invece di pazienti in stadio I o II senza malattia bulky sono raccomandate dosi di 20-30 Gy dopo ABVD e di 30 Gy dopo Stanford V. Nel caso dei pazienti trattati con BEACOPP la dose raccomandata è di 30-36 Gy.

Chemioterapia

Nel 1964 il National Cancer Institute (NCI) sviluppò il primo programma di polichemioterapia per il trattamento del linfoma di Hodgkin, consistente nella combinazione di quattro farmaci: mostarda azotata (Mecloretamina), vincristina, procarbazine e prednisone (MOPP). La sua introduzione portò a curare oltre il 50% dei pazienti con malattia in stadio III-IV, accompagnandosi però a importanti effetti collaterali a breve e a lungo termine (Tab.V) che spinsero a ricercare trattamenti alternativi ⁴⁶. Lo schema ABVD, introdotto nel 1975 da Bonadonna, come terapia di seconda linea in caso di ricaduta dopo MOPP ^{47,48}, è diventato a partire dal 1992 il trattamento d'elezione per il linfoma di Hodgkin avanzato precedentemente non trattato. Infatti nello studio del CALGB, che andava a confrontare ABVD, MOPP e MOPP alternato ad ABVD negli stadi III-IV di malattia o in caso di ricaduta dopo radioterapia, l'ABVD ha dimostrato una sopravvivenza libera da eventi a 3 anni del 64% rispetto al 48% della sola MOPP, e sovrapponibile a quella della MOPP alternata ad ABVD ma con meno effetti collaterali.

Nei primi anni Novanta l'avvio di alcuni trial clinici indirizzati sulla dose-intensity e l'introduzione dell'Etoposide come nuovo chemioterapico, portarono allo sviluppo di diversi protocolli terapeutici come il BEACOPP (Bleomicina, Etoposide, Adriamicina, Ciclofosfamida, Oncovin, Procarbazina, Prednisone) e lo Stanford V (Doxorubicina, Vinblastina, Mecloretamina, Vincristina, Bleomicina, Etoposide, Prednisone)⁴⁹. Questi nuovi regimi, supportati da fattori di crescita ematopoietici, mirano a ridurre l'intervallo di tempo del trattamento ed a facilitare una maggiore e più prolungata concentrazione di farmaci citotossici nell'organismo, assicurando così un incremento nel controllo del tumore.

Tabella V. Tossicità a lungo termine dei protocolli MOPP e ABVD.

Chemioterapia	Tossicità tardiva
MOPP	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Azoospermia o oligospermia permanente</i> • <i>Perdita della funzionalità ovarica</i> • <i>Sindromi mielodisplastiche</i> • <i>Leucemia acuta</i> • <i>Aumento incidenza di cancro al polmone, alla mammella e di linfoma non Hodgkin</i>
ABVD	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Azoospermia reversibile</i> • <i>Amenorrea reversibile</i> • <i>Riduzione della funzionalità polmonare (bleomicina; soprattutto se associata a irradiazione mediastinica)</i> • <i>Cardiomiopatia (rara, in genere per dosi di doxorubicina > 400mg/m²)</i>

Il trattamento combinato beneficia sia della chemioterapia che della radioterapia, ma il ruolo di quest'ultima, se è consolidato nella malattia "bulky", nel III – IV stadio rimane controverso. Il razionale per l'utilizzo in adiuvante della radioterapia negli stadi III-IV, si basa sulle seguenti osservazioni:

1) la radioterapia può convertire in remissioni complete delle risposte

parziali dopo la chemioterapia;

2) la maggioranza delle ricadute post chemioterapia si presenta nelle aree linfonodali dei siti precedentemente coinvolti ⁵⁰⁻⁵².

Una meta-analisi, condotta su 14 studi, ha dimostrato che l'irradiazione a basse dosi dei siti iniziali di malattia incrementa di circa l'11% il tasso di controllo tumorale, senza però avere effetti sull'overall survival; anzi, risulterebbe un decremento di eventi fatali nei pazienti in remissione completa continua se non trattati con radioterapia ⁵³. Proprio a causa degli effetti collaterali tardivi associati, quali la tossicità cardiopolmonare e il rischio di seconde neoplasie, il volume di irradiazione è limitato sole alle regioni anatomiche a più alto rischio di recidiva ⁵⁴. La radioterapia assume un ruolo fondamentale, e diviene parte integrante del trattamento, nel protocollo Stanford V, ideato nel 1988 a Stanford dal gruppo di Sandra J. Horning, sulla scorta di due osservazioni:

1) negli stadi I-II intermedi o sfavorevoli (cioè con fattori di rischio) trattati con ABVD circa il 5% dei pazienti presentava malattia in progressione durante la terapia e circa il 15% ricadeva precocemente, con un alto tasso di resistenza alla terapia di salvataggio ⁵⁰;

2) l'ABVD si associava ad un'importante tossicità polmonare (da bleomicina) e cardiaca (da doxorubicina), specialmente se accompagnato da un'irradiazione mediastinica ⁵⁴.

Dal momento che sia la tossicità cardiopolmonare, sia la sterilità, sia il rischio di sviluppare una leucemia sono solitamente correlati alla dose cumulativa del singolo farmaco, lo Stanford V venne progettato in modo da massimizzare la dose intensity, limitando al contempo la dose totale di doxorubicina (150 mg/m²), bleomicina (30 U/ m²) e mostarda azotata (18 mg/ m²) ed eliminando la procarbazine ^{55,56}. I primi risultati, pubblicati nel 1995, riportavano una sopravvivenza libera da fallimento (FFS) ed una sopravvivenza globale (OS) a 3 anni rispettivamente dell'87% e del 96% in 65 pazienti con stadio III o IV o I-II con malattia "bulky"; in particolare nello stadio II l'FFS a 3 anni era del 100%, nello stadio III del 92% e nello stadio IV del 76%

Un recente studio ha ulteriormente confermato l'efficacia dello schema di trattamento STANFORD V seguito da radioterapia sulle lesioni bulky, se confrontato con lo schema ABVD, in termini di failure free survival e overall survival ⁵⁷.

Negli anni '90 il German Hodgkins Study Group (GHS) sviluppò il nuovo regime BEACOPP ^{58,59} (Tab. VI). Il gruppo tedesco, partendo dall'evidenza che l'outcome del trattamento era correlato alla dose-intensity della chemioterapia, e che questa può essere migliorata o aumentando la dose dei farmaci o diminuendo il loro intervallo di somministrazione, sviluppò questo schema che, rispetto all'ABVD, introduceva l'Etoposide e aumentava sia il numero che la dose dei farmaci somministrati.

Tabella VI. Schema dei regimi chemioterapici BEACOPP e escalatedBEACOPP

	BEACOPP		Giorni di somministrazione
	ESCALATED	BASELINE	
BLEOMICINA	10 mg/m ²	10 mg/m ²	Giorno 8
ETOPOSIDE	200 mg/m ² /giorno	100 mg/m ² /giorno	Giorni 1-3
DOXORUBICINA	35 mg/m ²	25 mg/m ²	Giorno 1
CICLOFOSFAMIDE	1250 mg/m ²	650 mg/m ²	Giorno 1
ONCOVIN (VINCRISTINA)	1,4 mg/m ² (max 2 mg)	1,4 mg/m ² (max 2 mg)	Giorno 8
PROCARBAZINA	100 mg/m ² /giorno	100 mg/m ² /giorno	Giorni 1-7
PREDNISONE	40 mg/m ² /giorno	40 mg/m ² /giorno	Giorni 1-14

Lo studio randomizzato HD9 ⁶⁰ comparava lo schema cardine MOPP/ABVD con i due regimi BEACOPP (baseline ed escalated) senza l'utilizzo contemporaneo di fattori di crescita, dimostrando un aumento significativo dell'FFTF (Freedom from Treatment Failure) e OS nei pazienti sottoposti a chemioterapia a base di BEACOPP escalated. Uno studio successivo ⁶¹ confermava la superiorità del BEACOPP escalated in

termini di FFTF e OS anche con l'aggiunta di fattori di crescita (Filgrastim). Lo schema induceva tuttavia una forte tossicità, sia a breve che a lungo termine: una severa neutropenia che comportava un'aumentata mortalità per cause infettive, un aumento di leucemie e tumori solidi post-chemioterapia. Per questo motivo si cercò di ridurre la tossicità dello schema mantenendone tuttavia l'efficacia: lo studio HD 12⁶² comparava i risultati di due gruppi di pazienti, un primo sottoposto a 8 cicli di BEACOPP escalated, un secondo sottoposto a 4 cicli di BEACOPP escalated seguiti da 4 cicli di BEACOPP baseline, entrambi i gruppi di pazienti erano sottoposti ad un'eventuale terapia radiante di consolidamento in caso di residui di malattia. Lo studio, tuttavia, non dimostrò una significativa differenza in termini di riduzione della tossicità nel caso di pazienti sottoposti a dosi minori di chemioterapici negli ultimi 4 cicli di terapia. Lo studio HD15⁶³, invece, uno studio multicentrico che includeva 2182 pazienti con nuova diagnosi di linfoma di Hodgkin in stadio avanzato, ha dimostrato una maggiore overall survival (OS), un maggior controllo della malattia oltre ad una minor tossicità con 6 cicli di BEACOPP escalated quando comparati con 8 cicli dello stesso, ha inoltre dimostrato che la RT può essere omessa in quei casi con risposta parziale e con residui linfonodali inferiori ai 2,5 cm o maggiori di 2,5 cm ma PET negativi. Tuttavia, data l'elevata tossicità del regime BEACOPP, questo non dovrebbe essere utilizzato in pazienti con più di 60 anni di età: è stata infatti vista una percentuale di mortalità legata al trattamento maggiore in questo gruppo (pazienti >60 anni)^{64,65}.

Pochi sono stati fino ad ora gli studi di confronto testa a testa fra i principali regimi di chemioterapia usati nel trattamento del linfoma di Hodgkin⁶⁶. Il lavoro di Viviani et al. ha confrontato lo schema escalatedBEACOPP con ABVD nei pazienti con malattia in stadio III e IV e considerando anche l'apporto della terapia di salvataggio. Seppure il BEACOPP si associ ad una maggior tossicità ematologica, la OS al termine della strategia di salvataggio è paragonabile tra i pazienti che hanno ricevuto in prima linea BEACOPP o ABVD⁶⁷.

Esiste una frazione di pazienti che non risponde alla chemioterapia di prima linea (si parla in questo caso di pazienti *refrattari*: progressione durante il trattamento o recidiva entro tre mesi dal termine della chemioterapia di prima linea) o che ricade dopo aver ottenuto una remissione completa.

Attualmente il trattamento di scelta per questa tipologia di pazienti prevede la chemioterapia ad alte dosi con reinfusione di cellule staminali autologhe ematopoietiche.

Due studi randomizzati hanno dimostrato il beneficio di un simile approccio. In un primo studio sono stati randomizzati 40 pazienti dopo una terapia di induzione con miniBEAM, a proseguire con la stessa terapia o a ricevere una HDC con BEAM (BCNU, Etoposide, Ara-C, Melphalan). Lo studio ha dimostrato una migliore EFS (Event Free Survival) e DFS (Disease Free Survival) nel braccio con HDC ⁶⁸

Un secondo ⁶⁹ ha dimostrato che dopo una terapia di salvataggio efficace, che permette di ottenere una remissione parziale o completa, la HDC migliora in modo significativo la FFTF a tre anni, pur non evidenziando una differenza significativa per quanto riguarda l'OS.

Altri studi non randomizzati hanno confermato che circa il 60% dei pazienti con malattia chemiosensibile rimane libero da ricaduta dopo HDC; inoltre la mortalità trapiantologica è bassa (meno del 5% nei più recenti studi). In alcuni studi sono stati evidenziati alcuni fattori prognostici che influenzano i risultati dopo HDC: tra questi la sensibilità alla terapia di salvataggio si è rivelato il più importante in termini di sopravvivenza ⁷⁰. In quei pazienti che recidivano dopo HDC è possibile intervenire con trapianto allogenico: attualmente sono disponibili studi ⁷¹⁻⁷³ in cui il trapianto allogenico è stato effettuato dopo ricaduta e attraverso i quali si è osservato che la presenza di graft versus host disease si correla ad una riduzione dell'incidenza di ricadute post-allo, la sopravvivenza dei pazienti in ricaduta post HDC è superiore per i pazienti allotrapiantati rispetto ai non trapiantati, la OS e la PFS sono abbastanza riproducibili nei vari studi, aggirandosi intorno al 50-60% e al 25-30% rispettivamente.

Il trattamento dei pazienti con malattia recidivata dopo chemioterapia ad

alte dosi rappresenta un problema irrisolto nella gestione dei linfomi di Hodgkin. Con le terapie tradizionali la probabilità di ottenere una significativa riduzione di malattia è limitata, anche per la ridotta tolleranza agli schemi di polichemioterapia in pazienti pesantemente pretrattati. Lo scenario tuttavia sembra essersi modificato con l'introduzione del Brentuximab vedotin, un anticorpo monoclonale anti CD-30 coniugato con un veleno del fuso (auristatina E). Il legame dell'anticorpo coniugato al CD30 di superficie cellulare avvia l'internalizzazione del complesso, con successivo spostamento nel comparto liposomiale. All'interno delle cellule si ha rilascio della singola specie attiva, definita mono-metil-auristatina E (MMAE), tramite scissione proteolitica. Il legame di MMAE alla tubulina interferisce con la rete microtubulare internamente alla cellula, inducendo l'arresto del ciclo cellulare e la morte per apoptosi delle cellule tumorali che esprimono CD30. In uno studio pilota multicentrico di fase II che ha valutato 102 pazienti con HL recidivato o refrattario dopo trapianto autologo, il Brentuximab induceva una risposta oggettiva e una remissione completa nel 75% e nel 34% dei pazienti, rispettivamente, con un follow up medio di circa 1,5 anni. La PFS media per tutti i pazienti e la durata media della risposta per quelli in RC è stata rispettivamente di 5,6 mesi e 20,5 mesi ⁷⁴. Sulla base del risultato di questo studio, l'FDA ha approvato l'utilizzo del Brentuximab Vedotin per il trattamento dei pazienti con linfoma di Hodgkin recidivato dopo trapianto autologo o dopo almeno due regimi chemioterapici in pazienti non candidabili all'autotrapianto.

Anche Bendamustina, un antineoplastico che associa nella sua struttura chimica un agente alchilante (mostarda azotata) ed un antimetabolita analogo della purina, ha mostrato una discreta efficacia associata ad un buon profilo di tollerabilità. Nello studio di Moskowitz, Bendamustina è stata somministrata a pazienti con malattia refrattaria/recidivata dopo trapianto autologo o non candidabili allo stesso, con un tasso di ORR (Overall Response Rate) del 53% ⁷⁵.

E' in studio la combinazione con Bendamustina e Brentuximab: i dati

preliminari sembrano estremamente promettenti e si attende il completamento dei trial in corso.

Infine un recentissimo studio ha valutato, in 23 pazienti affetti da linfoma di Hodgkin recidivo/refrattario e pesantemente pretrattati, la tollerabilità e l'efficacia di Nivolumab, un anticorpo monoclonale anti PD-1.

Una risposta obiettiva al trattamento si è osservata in 20 pazienti (87%) con un 17% di remissioni complete e un restante 70 di remissioni parziali. La progression free survival a 24 mesi è stata dell'86% ⁷⁶.

1.7 Valutazione della risposta al trattamento

La valutazione della risposta alla terapia viene oggi effettuata sulla base dei criteri di Cheson ⁷⁷(vedi Tabella VII).

La valutazione PET si basa sui criteri di Deauville, ovvero una valutazione visiva della PET che produce uno score da 1 a 5, riconosciuta da tutta la comunità scientifica dopo un primo incontro internazionale tra clinici e medici nucleari svoltosi a Deauville, in Francia ⁷⁸. Lo score 1 indica l'assenza di uptake di FDG, score 2: uptake \leq al mediastino, score 3: $>$ del mediastino ma \leq al fegato, score 4: moderatamente più alto del fegato, score 5: marcatamente più alto del fegato con comparsa di nuove lesioni.

Una delle applicazioni di maggior interesse della PET riguarda la cosiddetta analisi "ad interim", ossia dopo un numero limitato (da 1 a 4) di cicli di chemioterapia. Da un punto di vista biologico una interim PET negativa indica che la neoplasia è sensibile al trattamento in corso, e il valore predittivo negativo di tale esame supera il 90% nel linfoma di Hodgkin e l'80% nei linfomi non Hodgkin ad alto grado ^{33,34}.

Tabella VII. Criteri di Risposta

Table 3. Revised Criteria for Response Assessment		
Response and Site	PET-CT-Based Response	CT-Based Response
Complete	Complete metabolic response	Complete radiologic response (all of the following)
Lymph nodes and extralymphatic sites	Score 1, 2, or 3* with or without a residual mass on 5PS† It is recognized that in Waldeyer's ring or extranodal sites with high physiologic uptake or with activation within spleen or marrow (eg, with chemotherapy or myeloid colony-stimulating factors), uptake may be greater than normal mediastinum and/or liver. In this circumstance, complete metabolic response may be inferred if uptake at sites of initial involvement is no greater than surrounding normal tissue even if the tissue has high physiologic uptake	Target nodes/nodal masses must regress to ≤ 1.5 cm in LDi No extralymphatic sites of disease
Nonmeasured lesion	Not applicable	Absent
Organ enlargement	Not applicable	Regress to normal
New lesions	None	None
Bone marrow	No evidence of FDG-avid disease in marrow	Normal by morphology; if indeterminate, IHC negative
Partial	Partial metabolic response	Partial remission (all of the following)
Lymph nodes and extralymphatic sites	Score 4 or 5† with reduced uptake compared with baseline and residual mass(es) of any size At interim, these findings suggest responding disease At end of treatment, these findings indicate residual disease	$\geq 50\%$ decrease in SPD of up to 6 target measurable nodes and extranodal sites When a lesion is too small to measure on CT, assign 5 mm \times 5 mm as the default value When no longer visible, 0 \times 0 mm For a node > 5 mm \times 5 mm, but smaller than normal, use actual measurement for calculation
Nonmeasured lesions	Not applicable	Absent/normal, regressed, but no increase
Organ enlargement	Not applicable	Spleen must have regressed by $> 50\%$ in length beyond normal
New lesions	None	None
Bone marrow	Residual uptake higher than uptake in normal marrow but reduced compared with baseline (diffuse uptake compatible with reactive changes from chemotherapy allowed). If there are persistent focal changes in the marrow in the context of a nodal response, consideration should be given to further evaluation with MRI or biopsy or an interval scan	Not applicable
No response or stable disease	No metabolic response	Stable disease
Target nodes/nodal masses, extranodal lesions	Score 4 or 5 with no significant change in FDG uptake from baseline at interim or end of treatment	$< 50\%$ decrease from baseline in SPD of up to 6 dominant, measurable nodes and extranodal sites; no criteria for progressive disease are met
Nonmeasured lesions	Not applicable	No increase consistent with progression
Organ enlargement	Not applicable	No increase consistent with progression
New lesions	None	None
Bone marrow	No change from baseline	Not applicable
Progressive disease	Progressive metabolic disease	Progressive disease requires at least 1 of the following PPD progression:
Individual target nodes/nodal masses	Score 4 or 5 with an increase in intensity of uptake from baseline and/or	An individual node/lesion must be abnormal with: LDi > 1.5 cm and Increase by $\geq 50\%$ from PPD nadir and An increase in LDi or SDi from nadir 0.5 cm for lesions ≤ 2 cm 1.0 cm for lesions > 2 cm In the setting of splenomegaly, the splenic length must increase by $> 50\%$ of the extent of its prior increase beyond baseline (eg, a 15-cm spleen must increase to > 16 cm). If no prior splenomegaly, must increase by at least 2 cm from baseline
Extranodal lesions	New FDG-avid foci consistent with lymphoma at interim or end-of-treatment assessment	New or recurrent splenomegaly New or clear progression of preexisting nonmeasured lesions
Nonmeasured lesions	None	

(continued on following page)

Response and Site	PET-CT-Based Response	CT-Based Response
New lesions	New FDG-avid foci consistent with lymphoma rather than another etiology (eg, infection, inflammation). If uncertain regarding etiology of new lesions, biopsy or interval scan may be considered	Regrowth of previously resolved lesions A new node > 1.5 cm in any axis A new extranodal site > 1.0 cm in any axis; if < 1.0 cm in any axis, its presence must be unequivocal and must be attributable to lymphoma Assessable disease of any size unequivocally attributable to lymphoma
Bone marrow	New or recurrent FDG-avid foci	New or recurrent involvement

1.8 Complicanze a lungo termine

Il miglioramento delle tecniche per la cura del linfoma di Hodgkin ha comportato una prognosi decisamente più favorevole, con tassi di sopravvivenza globale a lungo termine superiori all'80%⁷⁹. Il prezzo che però viene pagato dai sopravvissuti è molto alto e si riflette nelle complicanze a lungo termine (Tab. VIII)

Tabella VIII. Complicanze tardive dopo il trattamento combinato chemioterapia + radioterapia del linfoma di Hodgkin.

Gonadiche	Gastrointestinali	Immunitarie	Muscolo scheletriche	Altre
Infertilità	Ulcere o malattia gastrica / duodenale	Linfopenia (2)	Atrofia dei tessuti molli e deformità scheletriche	Xerostomia
Azoospermia	Gastriti	Complicazioni infettive (3)	Necrosi avascolare	Fibrosi vescicale/cistite emorragica
	Ostruzione/perforazione piccolo intestino	Sepsi batterica	Scioglimento dell'epifisi o del capiteo femorale	Distruzione renale
		Herpes zoster Polmoniti Infezioni cutanee Mielosoppressione	Osteoporosi	Mielopatia da radiazioni Neuropatie periferiche Astenia Depressione Difficoltà nell'adattamento psicosociale (4)

(1) più comunemente leucemia non linfocitica acuta (ANLL)
 (2) sia linfociti B che T
 (3) Gram + con capsule più comuni: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*
 Ad esempio: sofferenza, immagine distorta o pessima del proprio corpo, continua sensazione di nausea e vomito, diminuzione della libido e dell'attività sessuale, discriminazione sul lavoro, rifiuto della vita, percezione di negativi

Seconde neoplasie	Cardiovascolari	Polmonari	Tiroide
Leucemia (1)	Pericardite costrittiva cronica	Polmoniti da radiazioni o da bleomicina	Ipotiroidismo
Sindromi mielodisplastiche	Versamento pericardico	Fibrosi polmonare	Iperitiroidismo Morbo di Graves Tiroiditi
Linfoma non Hodgkin	Tamponamento pericardico		Tireotossicosi
Tumori solidi - polmone - mammella - tiroide - tessuti molli - osso - cervice - melanoma - esofago - stomaco - pancreas - colon - retto - ghiandole salivari - pelle - vescica	Aritmie Miocarditi Cardiomiopatie Distensione coronarica Difetti valvolari		Noduli benigni

Con un lungo follow-up dai 15 ai 19 anni dopo la diagnosi di linfoma, il rischio di decesso per altre cause, in particolar modo seconde neoplasie, inizia a superare quello relativo al linfoma ⁸⁰ (Fig. 2).

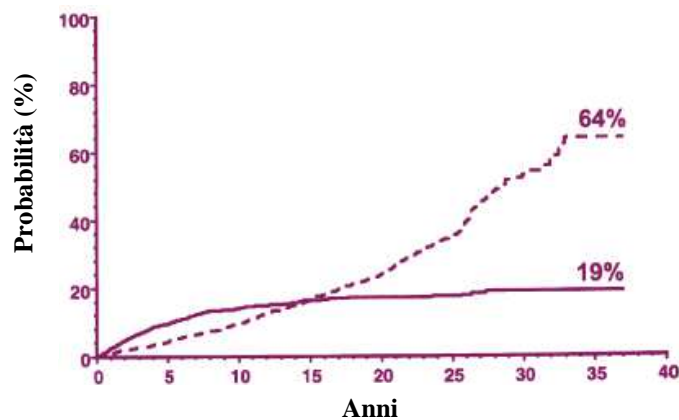


Figura 2. Risultati dell'analisi di Stanford sul rischio attuariale di mortalità dovuta al linfoma di Hodgkin (linea continua) o a patologie intercorrenti (linea tratteggiata).

Complicanze neoplastiche

La causa più frequente di morte nei pazienti in remissione completa è rappresentata da seconde neoplasie. Tra i pazienti trattati con terapie combinate presso la Stanford University (Tab. IX), il 38% dei decessi non correlati direttamente al linfoma è attribuibile ad un seconda neoplasia e il decesso per tumore è 6 volte superiore a quello della popolazione generale di pari età .

Tabella IX. Cause di morte fra 2498 pazienti trattati per linfoma di Hodgkin presso la Stanford University (Hoppe RT, 1997) e fra 794 pazienti trattati presso lo Joint Center con trattamento combinato (Mauch PM, 1995).

	Stanford (1)			Joint Center(2)		
	Pazienti		Decessi (%)	Pazienti		Decessi (%)
	Nº	%		Nº	%	
Totale pazienti	2498	100		794	100	
Totale decessi	754	30.2	100	124	15.6	100
• LH	333	13.3	44	56	7.0	45
• Seconde neoplasie	160	6.5	21	36	4.5	29
• Cardiovascolari	117	4.8	16	15	1.9	12
• Polmonari	50	2.0	7	1	0.1	1
• Infezioni	31	1.3	4	8	1.0	6
• Accidentali	14	0.6	2	3	0.4	2
• Altro	49	2.0	7	4	0.5	3

(1) Tutti gli stadi trattati dal 1960-1995: follow-up valutato 12 anni
 (2) soltanto stadi IA-IIB con laparatomia trattati dal 1969-1988: follow-up valutato 11 anni

Vi sono comunque delle difficoltà nel quantificare l'effettiva portata del rischio, tra queste la lunga latenza delle neoplasie solide, il contributo della dose intensity delle combinazioni dei chemioterapici e la dose cumulativa, la variabilità del campo di irradiazione e della dose erogata^{81,82}.

➤ *Seconde leucemie*

La leucemia fu la prima neoplasia la cui comparsa venne correlata al trattamento per linfoma di Hodgkin, a causa del suo periodo di latenza

relativamente breve, della sua rarità nella popolazione e per l'elevato rischio relativo. Rispetto alla popolazione generale, infatti, si osserva un aumento del rischio dalle 10 a oltre le 80 volte.

Un aumento del rischio di leucemia può essere osservato sia precocemente che a 2-4 anni dall'inizio della chemioterapia, con un picco tra i 5 e i 10 anni e una riduzione dell'incidenza negli anni successivi. In studi con alti numeri di lungo sopravvissuti, è stato notato un significativo aumento del rischio anche dopo 15 anni dal trattamento^{80,83,84,85,86,87,88}. In oltre il 90% dei casi le leucemie secondarie sono leucemie acute della serie mieloide (LMA), mentre risultano più rare le varietà linfoblastica acuta e mieloide cronica. In più del 50% dei casi sono precedute da una fase preleucemica (pancitopenia refrattaria ai corticosteroidi), che può persistere per diversi mesi e talora portare al decesso del paziente prima di evolvere in leucemia acuta, evoluzione che in genere si verifica entro un anno^{85,88}.

I principali fattori di rischio per lo sviluppo di queste forme sono rappresentati dalla chemioterapia con agenti alchilanti e inibitori della topoisomerasi, dalla dose dei chemioterapici, dalla radioterapia, dal ritrattamento per recidiva di malattia, dalla splenectomia, dall'immunosoppressione, dall'età alla diagnosi (≥ 40 anni) e dallo stadio di malattia (III-IV) ..

Per quanto riguarda la LMA da alchilanti il maggior rischio leucemogeno è legato alla mecloretamina (dopo la MOPP, l'incidenza cumulativa di leucemia a 15 anni è del 6-9%) e sembra aumenti in relazione all'incremento del numero di cicli con MOPP o con regimi MOPP simili⁸⁹⁻⁹³. Il rischio di seconde leucemie dopo trattamento con solo schema ABVD (non contenente né alchilanti né procarbazine) risulta invece molto basso o forse nullo⁸⁶. A 15 anni il rischio cumulativo è dello 0.7% rispetto al 9.5% riscontrato con la MOPP.

L'International Agency for Research on Cancer (IARC) ha incluso le epipodofillotossine, etoposide e teniposide, nella categoria dei farmaci potenzialmente cancerogeni per l'uomo⁹⁴. Comparata con la variante leucemica indotta dagli alchilanti, la LMA correlata alle epipodofillotossine

(sottotipi M4 o M5 nella classificazione FAB) presenta un periodo di induzione minore, mediamente entro i due – tre anni successivi al trattamento, e non è preceduta da una fase mielodisplastica.

➤ *Linfoma non Hodgkin secondario*

I linfomi non Hodgkin secondari contribuiscono a meno del 5% della mortalità nei lungo sopravvissuti. Il rischio cumulativo è piuttosto basso, tra il 2 e il 4% a 20 anni post terapia⁹⁰, mentre il rischio relativo, comparato con quello della popolazione generale, appare già alto nei primi 5 anni e varia da 6 a 36 volte, aumentando con follow-up sempre maggiori^{83,89,95}.

L'istotipo più rappresentato è il linfoma diffuso a grandi cellule B con tendenza ad insorgere nelle sedi extranodali più frequentemente rispetto ai linfomi non Hodgkin spontanei.

➤ *Secondi tumori solidi*

L'incidenza di tumori solidi a 15 anni dopo linfoma di Hodgkin si attesta attorno al 7-18%, ma poiché, rispetto alla popolazione generale, il rischio tende a crescere progressivamente con il follow-up, è probabile che la loro incidenza divenga ancora più significativa in futuro^{86,91}. In studi recenti con follow-up di 15 anni o più, il 65-75% delle seconde neoplasie è rappresentato da tumori solidi^{96,97}, e il rischio di una loro insorgenza è strettamente correlato all'età di inizio trattamento, all'intervallo di follow-up e al trattamento per il linfoma di Hodgkin^{80,83}. Il rischio relativo per tutti i tumori solidi, con follow-up a lungo termine, è aumentato da 2 a 4.5 volte rispetto a quello di una popolazione generale adulta e, diversamente dalle seconde leucemie, non raggiunge un picco nei primi anni post trattamento, bensì continua ad aumentare per almeno 25 anni⁹⁸⁻¹⁰⁰. (Fig. 3).

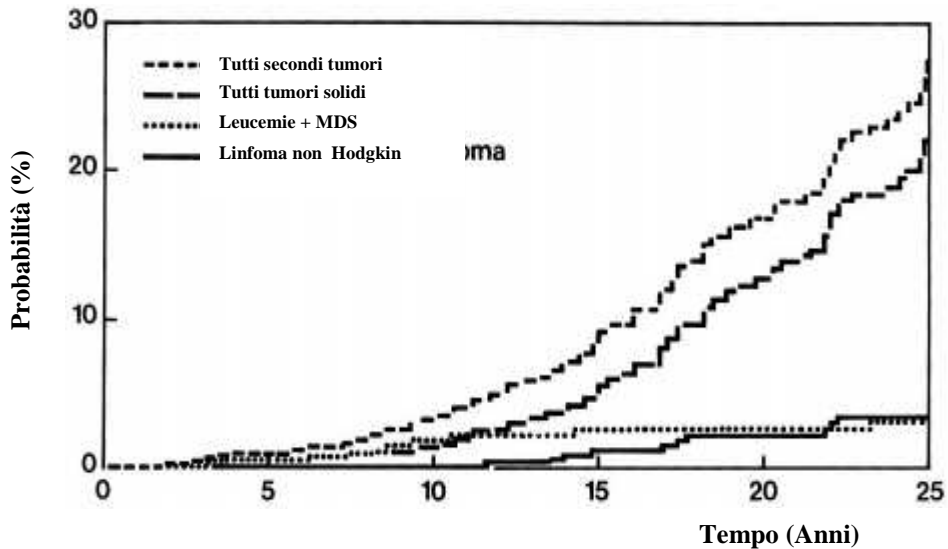


Figura 3. Rischio cumulativo delle seconde neoplasie dopo linfoma di Hodgkin.

La maggior parte dei secondi tumori solidi è correlabile al trattamento radiante. Almeno due terzi dei casi insorge all'interno del campo di irradiazione (mammella, polmone, tiroide, esofago) e il periodo di latenza tra il trattamento e l'insorgenza di queste neoplasie tende ad essere piuttosto prolungato, in accordo con la teoria della cancerogenesi da radiazione⁹¹.

Complicanze non neoplastiche

➤ *Tossicità cardiaca*

La tossicità cardiaca dei trattamenti per il linfoma di Hodgkin è la terza causa di morte in questi pazienti ed è legata soprattutto all'irradiazione del mediastino; la chemioterapia può da sola provocare cardiomiopatia, ma soprattutto può potenziare il danno indotto dal trattamento radiante.

L'incidenza di cardiopatia da raggi può essere influenzata da diversi fattori: dose totale, dose per frazione, tecnica di irradiazione (campo anteriore +/- posteriore), malattia mediastinica "bulky", e soprattutto durata del follow-up.

La radioterapia provoca soprattutto lesioni all'endotelio, con conseguente reazione infiammatoria, necrosi ischemica dei tessuti e successiva

organizzazione fibrotica. Le sezioni destre del cuore sono quelle più colpite in quanto, essendo anteriori, ricevono una maggior dose di irradiazione ¹⁰¹.

I quadri clinici tipici sono la pericardite costrittiva, la fibrosi miocardica, l'ispessimento delle corde tendinee e dei lembi valvolari, e la miocardiopatia ischemica, conseguente all'ispessimento fibrotico dei vasi coronarici ¹⁰¹; alterazioni vascolari sono rilevabili anche in altre sedi irradiate, come il collo e l'addome ^{101,102}. Inoltre è stato osservato un aumento di incidenza, parallelo al tempo trascorso dall'irradiazione, di ipertrofia ventricolare sinistra, blocco di branca destra e anomalie dell'onda Q, anomalie che si riscontrano con una frequenza maggiore rispetto alla popolazione generale ¹⁰².

La doxorubicina è il farmaco antitumorale più frequentemente associato a complicanze cardiache, in quanto può provocare la degenerazione delle cellule miocardiche e comparsa di miocardiopatia dilatativa; inoltre sembra avere un effetto sinergico con l'irradiazione a mantellina ¹⁰³.

Le complicanze cardiache sono però influenzate anche da altri fattori di rischio quali il fumo, l'ipertensione, l'obesità e l'ipercolesterolemia. Fondamentale è la programmazione di uno stretto screening, basato, oltre che sull'EGC e sulla riduzione al minimo dei fattori di rischio cardiovascolari, sull'ecocardiogramma a riposo e sotto stress, sulla scintigrafia cardiaca e sull'angiografia coronarica, programmata qualora vengano riscontrate anomalie nei due precedenti esami ¹⁰³.

➤ *Tossicità polmonare*

I pazienti con linfoma di Hodgkin spesso hanno malattia a livello toracico (localizzazioni mediastiniche e meno frequentemente polmonari e pleuriche), che può causare un danno diretto al tessuto polmonare mediante invasione dello stesso. In aggiunta, il trattamento sia radioterapico (principalmente in sede mediastinica) che chemioterapico (soprattutto se contenente bleomicina), può determinare un danno addizionale al parenchima polmonare. Studi sui sopravvissuti a lungo termine hanno

dimostrato una disfunzione polmonare nel 10 – 20% dei pazienti. Le alterazioni di più frequente riscontro sono rappresentate dalla polmonite attinica, una forma acuta di polmonite interstiziale, e dalla fibrosi polmonare cronica, correlate all'adozione, come approccio terapeutico, sia della sola radioterapia che della modalità combinata^{104,105}.

➤ *Tossicità tiroidea*

Varie sono le complicazioni tiroidee che si possono riscontrare nei pazienti trattati per linfoma di Hodgkin. Includono più comunemente ipotiroidismo primario, morbo di Graves, tiroidite autoimmune, cisti benigne e noduli, carcinoma papillare o follicolare^{106,107}.

L'ipotiroidismo primario è conseguenza frequente di un'irradiazione sovraclaveare o cervicale. Può essere clinico o subclinico e, benché il suo picco di incidenza si aggiri attorno ai 2 – 3 anni e in circa la metà dei pazienti compaia entro 5 anni dal termine del trattamento, in alcuni può insorgere anche 20 anni dopo^{106,107}.

➤ *Sterilità*

Sia la radioterapia che la chemioterapia possono determinare un'infertilità temporanea o permanente.

I rischi di una radioterapia frazionata sulla funzionalità gonadica non dipendono solo dalla minima dose erogata sulle ovaie, ma anche dall'età della paziente al momento del trattamento. In generale, in donne tra 15 e i 40 anni, dosi di 2.5 – 5 Gy comportano un rischio di infertilità permanente del 30 – 40%. La chemioterapia, soprattutto quella contenente alchilanti, sembra avere un effetto avverso sulla funzionalità ovarica. Benché la maggior parte dei pazienti incorra in un'azoospermia a breve termine, più dell'85% recupera la spermatogenesi. Anche i regimi terapeutici basati su agenti alchilanti (ad es. la MOPP) possono esitare in una sterilità permanente dose correlata⁸¹.

2. SCOPO

L'obiettivo dello studio è quello di identificare nuovi parametri prognostici per il Linfoma di Hodgkin basati su indagini emocromocitometriche e su analisi immunoistochimiche ottenute sulla biopsia diagnostica. Gli end point primari del nostro studio comprendono:

- 1) valutare l'impatto prognostico del rapporto linfociti/monociti alla diagnosi (ALC/AMC) in termini di Event Free Survival (EFS), intesa come il tempo trascorso tra la diagnosi e la data di progressione, recidiva o morte per qualsiasi causa. Il follow up dei pazienti ancora vivi e senza eventi è stato censurato alla data della loro ultima visita di controllo;
- 2) valutare l'associazione tra ALC/AMC e lo stadio di presentazione della malattia. Nel lavoro abbiamo definito come malattia limitata lo stadio IA, IB e IIA senza lesioni bulky. Si intende per stadio avanzato una malattia in stadio I o II bulky oppure in stadio III o IV indipendentemente dalla dimensione delle lesioni;
- 3) correlare le recidive/progressioni e lo stadio di presentazione alla diagnosi con la percentuale di macrofagi associati al tumore e l'angiogenesi tumorale determinati tramite indagine immunoistochimica mediante l'utilizzo di anticorpi anti CD105 e CD68.

Le analisi emocromocitometriche consistono nella determinazione dei linfociti alla diagnosi (parametro già incluso nello score IPS), dei monociti e del ratio linfociti/monociti (ALC/AMC). Le indagini immunoistochimiche valutano invece la quantità di macrofagi associati al tumore, presenti nell'esame istologico, osseo o linfonodale, diagnostico per Linfoma di Hodgkin, identificati dall'anticorpo anti CD68. E' stata inoltre studiata l'angiogenesi associata ai casi analizzati mediante la determinazione dell'anticorpo anti CD105.

3. MATERIALI E METODI

Nel nostro lavoro abbiamo considerato tutti i casi consecutivi di pazienti affetti da Linfoma di Hodgkin diagnosticati presso l'Istituto Oncologico Veneto (Oncologia Medica, Azienda Ospedaliera fino al 2006) dal 1 Gennaio 2004 fino al 1 Aprile 2015. Abbiamo inoltre valutato tutti i pazienti trattati presso i reparti di Oncologia dell'Ospedale di Vittorio Veneto e di Bassano del Grappa. (n=143)

La diagnosi di malattia è stata effettuata su base istologica mediante escissione linfonodale e/o biopsia osteomidollare, e la stadiazione con indagini strumentali (TC e PET) e biopsia ossea monolaterale secondo la classificazione di Ann Arbor/Costwolds³⁶.

Tutti sono stati considerati per l'analisi ALC/AMC (ratio linfociti/monociti), mentre per l'analisi immunoistochimica sono stati tenuti in considerazione solo 60 dei 143 pazienti. Sono stati esclusi dalla valutazione immunoistochimica i casi in cui i preparati istologici avevano dimensioni <1 cm.

I preparati raccolti negli anni 2004-2007 sono stati sottoposti a revisione istologica alla luce della classificazione WHO 2008.

L'esclusione dei casi con diagnosi di linfoma di Hodgkin a Prevalenza Linfocitaria Nodulare dalla valutazione immunoistochimica è dovuta al fatto che, sulla base dei più recenti studi, questo istotipo sembra avere un pattern istopatologico e di espressione genica sovrapponibile a quello del linfoma a grandi cellule (T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma, TCHRBCL), e quindi non sarebbe da considerare come un vero Linfoma di Hodgkin (Tab. X)^{108,109,31}.

Tabella X. Caratteristiche istologiche e markers immunofenotipici del LH classico e di altre neoplasie linfoidi

Marker	LH classico	LH a Prevalenza Linfocitaria nodulare	TCHRBCL
CD 30	+	-	-
CD 15	+	-	-
CD 20	-/+	+	+
CD 45	-	+	+
CD 79 a	-	+	+
ALK	-	-	-
EMA	-	+	+

Le analisi immunoistochimiche sono state eseguite su blocchetti di tessuto di dimensioni superiori a 1 cm, fissati in formalina e paraffinati.

I marcatori fenotipici determinati mediante analisi immunoistochimica sono stati:

- CD68, ricercato mediante l'anticorpo anti CD68 (clone PG-M1, mouse monoclonal, Dako, Glostrup, Denmark) per l'identificazione dei macrofagi associati al tumore (TAM);
- CD105, ricercato mediante l'anticorpo anti CD105 (clone SN6h, mouse monoclonal, Dako, Glostrup, Denmark), per la ricerca e identificazione della proteina Endogлина, normalmente presente su tutti i vasi. Nel nostro studio la proteina è stata valutata limitatamente alle cellule endoteliali primitive presenti nella biopsia diagnostica, diventando così indicativa della densità dei neovasi (Vessel Density, VD).

La percentuale delle cellule CD68+ è stata stabilita in relazione alla cellularità totale. Sulla base di queste caratteristiche i pazienti sono stati divisi in tre gruppi: <5% (bassa espressione, score 1), 5-25% (espressione intermedia, score 2), >25% (alta espressione, score 3).

Nel caso del marker CD105 la quantificazione immunoistochimica ha dimostrato una percentuale di positività variabile dal 5% al 30%.

La risposta al trattamento è stata valutata mediante tramite TAC eseguita come valutazione intermedia nel corso della terapia chemioterapico e con FDG-PET al termine del programma di cura secondo i revised response criteria for malignant lymphoma⁷⁷. Le valutazioni PET sono state eseguite secondo i criteri di Deauville. La durata della remissione è stata valutata clinicamente ogni 3 mesi e con TAC ogni 6 mesi per due anni dal termine dei trattamenti ed in seguito ogni 6 mesi con indagine TAC a cadenza annuale. La PET non è stata utilizzata per i controlli periodici.

Per ciascun soggetto i parametri clinici valutati al momento della diagnosi sono stati: emocromo con formula, rapporto linfociti/monociti, LDH, VES, β_2 microglobulina, albumina, valutazione IPS secondo Hansenclever³⁹, valutazione geriatrica multidimensionale (VGM) nei 5 pazienti con età maggiore di 70 anni^{110,111}, stadiazione secondo Ann Arbor.

4. ANALISI STATISTICA

Le curve ROC (Receiver Operating Characteristics) sono state utilizzate per determinare il cutoff ottimale di ALC (conta assoluta linfocitaria), AMC (conta assoluta monocitica) e ALC/AMC.

Il rapporto tra linfociti, monociti e ratio linfociti/monociti e EFS è stato valutato con un'analisi univariata mediante Regressione di Cox.

I risultati dell'analisi immunoistochimica sono stati correlati alle recidive/progressioni osservate e allo stadio di malattia, diviso in precoce e avanzato: per queste analisi sono stati utilizzati rispettivamente il Test di Mann-Whitney e la regressione logistica. Per le analisi di sopravvivenza l'end point primario è rappresentato dalla EFS, definita come il tempo trascorso dalla diagnosi fino alla recidiva/progressione, morte per qualsiasi

causa o ultimo follow up. Le curve di sopravvivenza sono state elaborate mediante il metodo di Kaplan -Meier

Valori di p inferiori a 0,05 sono considerati statisticamente significativi

L'analisi statistica è stata eseguita mediante programma SPSS versione 20.0

5. RISULTATI

5.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti e outcome

Sono stati considerati valutabili per le analisi descritte 143 pazienti. L'età media alla diagnosi era di 38 anni (range 17-80) con 77 pazienti maschi (54%) e 66 femmine (46%). Il periodo di follow up medio è stato di 40 mesi (range 5-120).

Centoventisei (126) pazienti presentavano diagnosi di linfoma di Hodgkin classico, di questi 95 (67%) avevano un istotipo a Sclerosi Nodulare, 20 un istotipo a Cellularità Mista (14%), 11 a Deplezione Linfocitaria (7%).

I rimanenti 17 (12%) avevano un Linfoma di Hodgkin a Prevalenza Linfocitaria Nodulare.

Cinquantotto (58) pazienti (41%) si presentavano con malattia in stadio limitato (IA, IB e II A senza lesioni bulky) e 85 (59%) in stadio avanzato (IIB con malattia bulky, III e IV A e B). Ventiquattro (24) pazienti (17%) avevano lesioni di tipo bulky (definite come una massa mediastinica che occupi più di 1/3 del diametro trasverso interno del torace a livello di T5-T6 su una radiografia antero-posteriore ³⁶ o lesione superiore ai 10 cm di diametro massimo in qualunque sede ⁷⁷).

Degli 85 pazienti in stadio avanzato è stato calcolato l'IPS ³⁹: 15 pazienti (18%) presentavano una malattia a basso rischio (IPS 0-1), 65 pazienti (76%) avevano un rischio intermedio (IPS 2-3) e 5 (6%) erano ad alto rischio (IPS 4-7).

Dei 21 pazienti in stadio avanzato con recidiva/progressione, 5 presentavano un rischio basso per IPS, 15 un rischio intermedio e 1 alto rischio con IPS 4.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti sono riassunte in Tabella XI.

Tabella XI. Caratteristiche dei pazienti

Pazienti		143	%
età alla diagnosi	Media	38 (range 17-80)	
Genere	F	66	46
	M	77	54
Istologia	Sclerosi Nodulare	95	67
	Cellularità Mista	20	14
	Deplezione Linfocitaria	11	7
	Prevalenza Linfocitaria	17	12
Stadio	I	9	6
	II	49	35
	III	33	23
	IV	28	19
	II Bulky	13	10
	III Bulky	5	3
	IV Bulky	6	4
Stadio	Limitato	58	41
	Avanzato	85	59
Sintomi	A	82	57
	B	61	43
IPS	0-1	15	18
	2-3	65	76
	4-7	5	6
LDH (mg/l)	Media \pm SD	358,6 \pm 135,47	

GB (x10 ³ /ml)	Media ± SD	8,59 ± 4,23	
Linfociti (%)	Media ± SD	19,53 ± 10,56	
Linfociti (x10 ³ ml)	Media ± SD	1,53 ± 1,12	
Monociti (x10 ³ /ml)	Media ± SD	0,72 ± 0,40	
Linfociti/Monociti	Media ± SD	3,58 ± 6,66	
Albumina (g/L)	Media ± SD	41,56 ± 5,98	
Emoglobina (g/L)	Media ± SD	12,63 ± 1,96	
Regimi CT			
	ABVD	106	74
	escalated BEACOPP	8	5
	STANFORD V	23	16
	Procarbazina	2	1
	Radioterapia esclusiva	4	4
Progrediti/recidivati	evento	38	27
morti	evento	11	7
Follow up (mesi)	Nr pazienti	143	
	Media	40	

I pazienti sono stati sottoposti a trattamento chemioterapico di prima linea con i seguenti regimi: ABVD (in 106 casi), STANFORD V (in 23 casi) o escalatedBEACOPP (in 8 casi).

Cinque pazienti avevano alla diagnosi una età superiore ai 70 anni: 3 sono stati considerati “unfit” secondo VGM^{110,111} e trattati con schema ABVD a dosi ridotte del 25%; negli altri 2 casi è stata invece utilizzata Procarbazine come monoterapia (pazienti “frail” per età >80 anni).

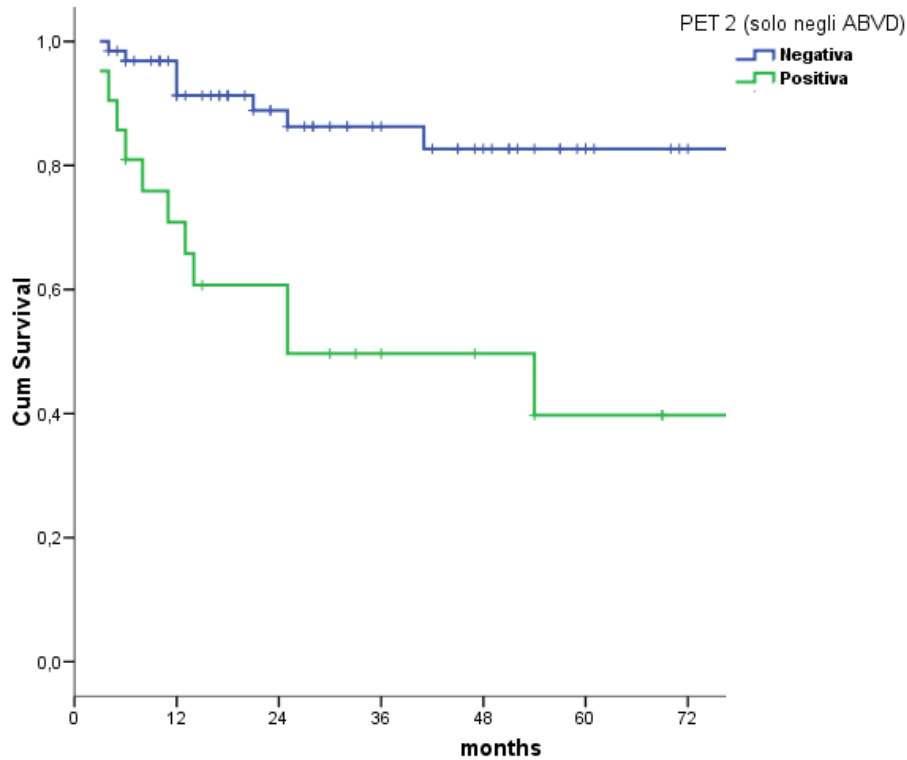
Quattro (4) pazienti con Linfoma di Hodgkin a prevalenza Linfocitaria Nodulare e malattia in stadio IA hanno ricevuto soltanto trattamento radiante.

Ottantasei dei 106 pazienti trattati secondo lo schema ABVD hanno eseguito una rivalutazione precoce mediante interim PET dopo 2 cicli di terapia. L’indagine ha fornito un quadro di remissione completa (RC) in 65 pazienti e di remissione parziale (RP) in 21 pazienti.

Dei 65 pazienti con PET 2 negativa, 8 hanno avuto recidiva (12%), mentre dei 21 pazienti con PET 2 positiva, 10 hanno ottenuto la negativizzazione dell’indagine PET alla fine del programma di trattamento e sono attualmente vivi e in buona salute. Gli altri 11 hanno presentato recidiva (52%).

La Progression Free Survival (PFS) mediana per i pazienti con PET 2 negativa non è stata raggiunta mentre è risultata di 25 mesi nei pazienti PET 2 positivi.

Anche nella nostra casistica, seppur limitata, i pazienti con remissione completa ad una PET 2 presentano una percentuale inferiore di recidive rispetto ai pazienti con remissione parziale³³. (Fig. 4)



PFS (mesi) PET 2

	Total N	N of Events	Nr Cen	% Cen	Median	Std. Error	IC 95%	pvalue
Negativa	65	9	56	86,2	.	.	.	<0,001
Positiva	21	12	9	42,9	25,00	21,65	0 67,4	

Figura 4. PFS in base alla PET 2

Novantuno (91) su 106 pazienti trattati con regime ABVD (85%) hanno ottenuto un quadro di RC al termine del trattamento di prima linea.

Venti (20) dei 23 pazienti trattati secondo schema STANFORD V (87%) erano in RC alla conclusione del programma di cura. Tutti e 8 i pazienti trattati secondo schema escalatedBEACOPP hanno presentato remissione completa.

Anche i 4 pazienti trattati con radioterapia esclusiva per Linfoma di Hodgkin a prevalenza linfocitaria nodulare hanno ottenuto un quadro di RC.

In 90 dei 143 pazienti è stata effettuata radioterapia di consolidamento involved field al dosaggio di 30 o 36 Gy (quest'ultimo dosaggio è stato somministrato in caso di malattia bulky).

In totale 123 pazienti hanno ottenuto un quadro di RC dopo la prima linea di terapia, 2 remissione parziale (monoterapia con Procarbazina), diciotto pazienti (12,5%) hanno presentato progressione di malattia al termine del programma di prima linea mentre altri diciotto hanno avuto recidiva di malattia durante il follow up.

Trentacinque (35) pazienti hanno ricevuto una terapia di seconda linea secondo schema DHAP (Desametasone, Citarabina, Cisplatino)¹¹² in 16 casi, IGEV (Ifosfamida, Gemcitabina, Vinorelbina, Prednisone)¹¹³ in 18 casi, R-ASHAP (Rituximab, Adriamicina, Metilprednisolone, Citosina Arabinoside, Cisplatino)¹¹⁴ in un caso. In 34 casi alla seconda linea di terapia è seguito un trapianto autologo di cellule staminali. Dei 35 pazienti sottoposti ad una seconda linea di terapia 23 hanno ottenuto RC e sono attualmente in buona salute e senza evidenza di malattia, in 12 casi si è invece osservata un'ulteriore progressione di malattia.

Undici (11) pazienti sono deceduti: in 8 casi il decesso si è verificato come progressione di malattia; in un caso il decesso è invece correlato alla comparsa di un secondo tumore (Leucemia Mieloide Acuta dopo chemioterapia secondo schema ABVD con RC al termine del trattamento per il linfoma); in due casi il decesso è imputabile ad un infarto miocardico acuto verificatosi successivamente ai trattamenti chemioterapici secondo schema ABVD.

Ad un follow up medio di 40 mesi su tutta la casistica (range 5-120 mesi) non è stata raggiunta la EFS mediana.

5.2 Valore prognostico di ALC, AMC e ALC/AMC

Il valore medio dei linfociti è stato di 1530 per mm³, deviazione standard di 1120, con una mediana di 1350 per mm³ (range 330-9700).

Il valore medio dei monociti è stato di $720 \text{ per } \text{mm}^3$, deviazione standard di 400, con una mediana di $610 \text{ per } \text{mm}^3$ (range 7-2570).

Il rapporto linfociti/monociti ha avuto una media di 3,58, con una deviazione standard di 6,66.

Sono state determinate le curve ROC per la EFS in relazione a ALC, AMC e ALC/AM. L'area sotto la curva (AUC) per ALC ha un valore di 0,61 (95% CI, 0,468-0,752), per AMC è risultata di 0,512 (95% CI, 0,358-0,666) mentre per il rapporto ALC/AMC è uguale a 0,558 (95% CI, 0,408-0,707) (Fig. 5-7).

Per nessuna di queste correlazioni è stato evidenziato un rapporto statisticamente significativo con la EFS dei pazienti.

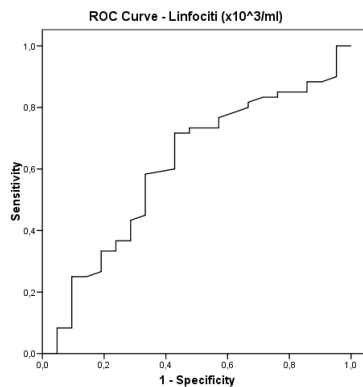


Figura 5. Curva ROC per EFS e ALC

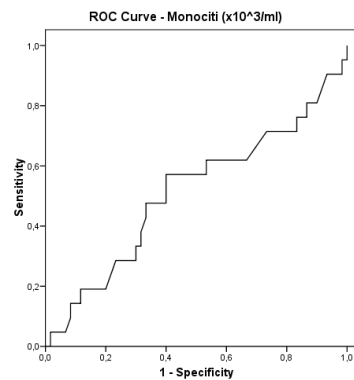


Figura 6. Curva ROC per EFS e AMC

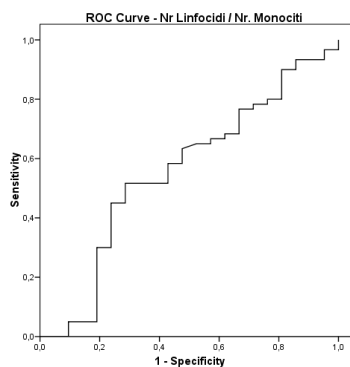


Figura 7. Curva ROC per EFS e ALC/AMC

Abbiamo poi correlato ALC, AMC e rapporto ALC/AMC con la EFS mediante Regressione di Cox.

Per ALC è stato evidenziato un Hazard Ratio (HR) di 1,149 con $p = 0,464$, per AMC l'HR è stato di 1,103 con $p = 0,855$. Infine per il rapporto ALC/AMC l'HR è risultato pari a 1,035 con $p = 0,086$. Non sono state quindi evidenziate correlazioni statisticamente significative tra la EFS e ALC, AMC e rapporto ALC/AMC alla diagnosi.

I valori di ALC, AMC e ALC/AMC sono stati inoltre correlati alla EFS limitatamente ai pazienti con stadio avanzato alla diagnosi (Tab XII).

Anche in questo caso non sono emerse differenze statisticamente significative.

Tabella XII. Analisi univariata per EFS mediante Regressione di Cox nei pazienti con stadio avanzato alla diagnosi

Variabili	P	HR	IC al 95% per HR	
			Valore minimo	Valore massimo
Linfociti ($\times 10^3/\text{ml}$)	0,217	1,202	0,897	1,611
Monociti ($\times 10^3/\text{ml}$)	0,567	1,493	0,379	5,886
Linfociti/Monociti	0,124	1,031	0,992	1,071

Abbiamo infine verificato la presenza di una possibile associazione tra lo stadio di malattia e ALC, AMC, ALC/AMC. Da ciò si è visto che il rapporto ALC/AMC risulta correlare con lo stadio di malattia ($p=0,035$). In particolare il valore mediano di ALC/AMC nei pazienti in stadio avanzato risulta essere inferiore (1,86) rispetto a quelli in stadio limitato (2,71) (Tab. XIII).

Tabella XIII. Test di Mann-Whitney per correlazione tra ALC, AMC e ALC/AMC e stadio di malattia limitato/avanzato

	Malattia limitata			Malattia avanzata			p
	Nr.	Media±DS	Mediana (range)	Nr.	Media±DS	Mediana (range)	
Linfociti (x10³/ml)	58	1,59±0,58	1,50 (0,39- 2,81)	85	1,52±1,35	1,27 (0,33- 9,70)	0,078
Monociti (x10³/ml)	58	0,69±0,45	0,55 (0,10- 2,57)	85	0,74±0,37	0,70 (0,01- 1,60)	0,121
Linfociti/Monociti	58	2,96±1,60	2,71 (0,23- 7,34)	85	4,02±8,38	1,86 (0,40- 47,14)	0,035

5.3 Valore prognostico di CD68 e CD105

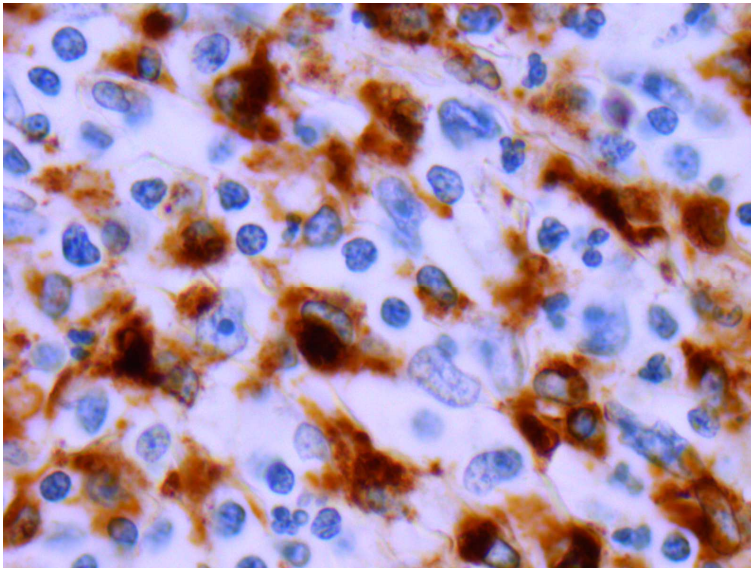


Fig 8. Indagine immunoistochimica per CD68

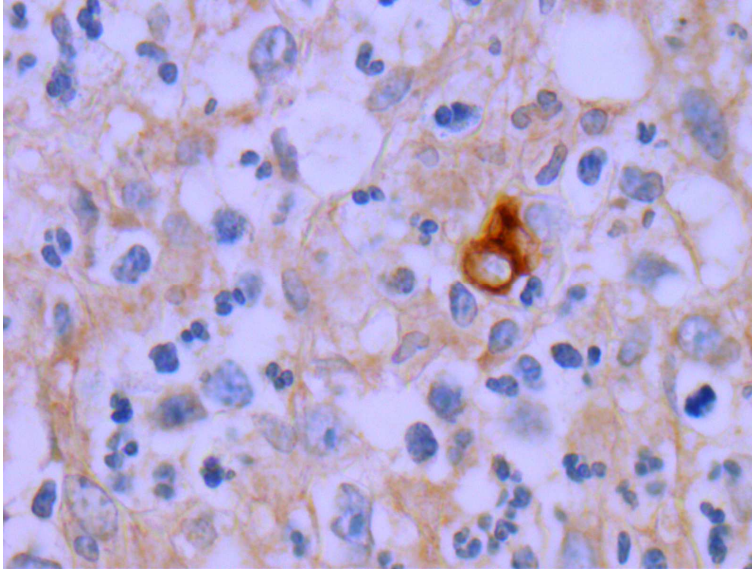


Fig 9. Indagine immunohistochimica per CD105

L'analisi immunohistochimica ha evidenziato una positività per CD68 <5% in 20 casi, tra 5% e 25% in 26 casi e >25% in 14 pazienti.

Per quanto riguarda il CD 105 abbiamo osservato una maggiore variabilità con una media di positività del 15% (range 5%-30%) (Tab. XIV) (Figura 7,8).

Tabella XIV. Caratteristiche dei pazienti con biopsie sottoposte ad indagine immunohistochimica

		Nr.	%
Pazienti		60	100
Stadio	Limitato	29	46
	Avanzato	31	54
Recidiva	Si	12	20
	No	48	80
CD 105 (%)	Media (DS)	15 (7,67)	
	Mediana (range)	10 (5-30)	
CD 68	<5%	20	32
	5-25%	26	44
	>25%	14	24

Abbiamo valutato l'eventuale correlazione tra la positività per CD68 e le recidive/progressioni non riscontrando nessuna differenza tra i tre sottogruppi (Tab. XV).

Tabella XV. Regressione logistica per CD68 con variabile dipendente non recidiva vs. recidiva

	Valore di p	HR	IC al 95% per HR	
			Valore minimo	Valore massimo
CD68 <5% vs >25%)	0,46	2,50	0,22	27,94
CD 68 (5-25% vs >25%)	0,30	3,33	0,34	32,96

Similmente abbiamo provato a correlare la positività per CD105 con le recidive/progressioni osservate (Fig. 9).

Anche in questo caso non sono emerse differenze statisticamente significative.

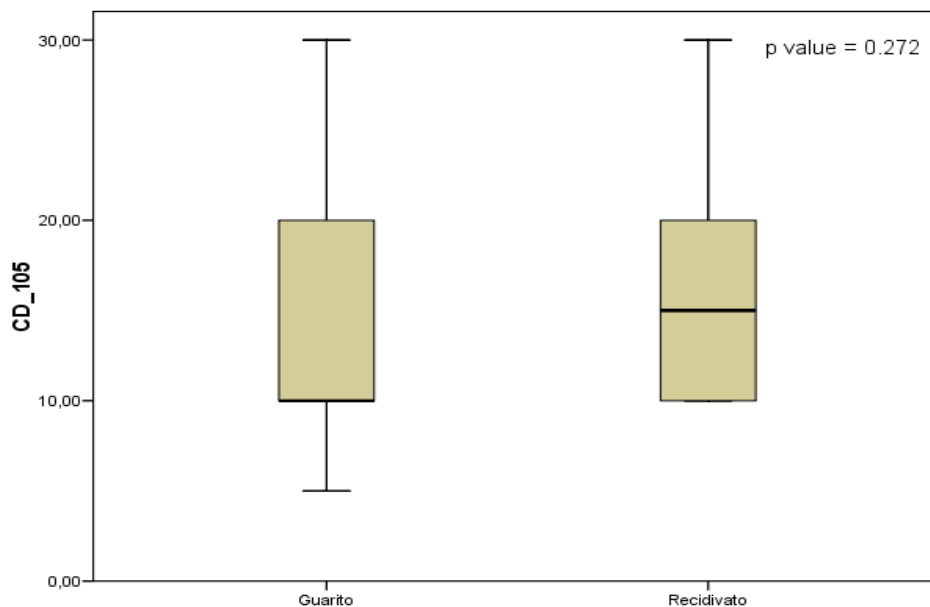


Fig. 10 Correlazione tra CD 105 e recidive/progressioni (Test di Mann-Whitney)

Abbiamo infine verificato la presenza di una possibile associazione tra lo stadio di malattia, distinto in limitato e avanzato, e la percentuale di CD68 e

CD105 riscontrate nella biopsia diagnostica. Anche in questo caso non abbiamo evidenziato alcuna correlazione statisticamente significativa (Tab. XVI).

Tabella XVI. Regressione logistica per CD68 e CD105 con variabile dipendente stadio precoce vs. avanzato

		I.C. al 95% per HR			
		Valore p	HR	Valore minimo	Valore massimo
CD68		0,33	0,50	0,13	2,00
(5% vs 25%)					
CD68		0,28	0,42	0,08	2,06
(5-25% vs 25%)					
CD105		0,67	0,98	0,91	1,06
(Variabile continua)					

6. DISCUSSIONE

Il nostro studio si è posto come obiettivo la determinazione di nuovi parametri prognostici utili per la stratificazione del rischio nei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin classico. Ad oggi i principali indici prognostici considerati sono l'IPS³⁹, e la positività o meno della PET ad interim dopo due cicli di terapia di induzione secondo schema ABVD³³. Altri parametri prognostici sfavorevoli per gli stadi precoci comprendono VES, numero di sedi extranodali e la presenza di lesioni bulky (linee guida del German Hodgkin Study Group). L'IPS tuttavia è stato validato solamente per i casi in stadio avanzato e non ci fornisce nessuna informazione sui pazienti con malattia limitata, cioè stadio I e II senza sintomi sistemici. Inoltre l'esecuzione della interim PET sembra cancellarne la stratificazione prognostica.

Entrambi non garantiscono l'accuratezza necessaria per poter disegnare un trattamento personalizzato per ogni paziente.

Lo studio del 2010 di Steidl¹¹⁵ ha introdotto una nuova prospettiva per la stratificazione del rischio nei pazienti affetti da questa patologia: partendo dall'evidenza dell'importante ruolo dei macrofagi nel processo di interazione tra cellule tumorali e microambiente circostante¹¹⁶, Steidl ha ipotizzato la presenza di un eventuale significato prognostico della quantità di macrofagi CD68+ associati al tumore (TAM) presenti nella lesione tumorale primitiva. Tramite uno studio di gene expression profiling effettuato su 130 campioni biotici ottenuti dalla biopsia diagnostica di pazienti affetti da Linfoma di Hodgkin classico, e confermato poi su una coorte indipendente di 166 pazienti affetti sempre da LH classico, Steidl ha evidenziato una forte associazione tra l'aumentata espressione di TAM e la riduzione di PFS (Progression Free Survival) e DSS (Disease-Specific Survival): la quantità di TAM sembra quindi essere un fattore predittivo di fallimento sia per il trattamento di prima linea che per quello di seconda linea in tutti gli stadi di linfoma di Hodgkin classico (lo studio mostrava

infatti come nei pazienti con stadio limitato dove non vi fosse un aumentato numero di TAM, la DSS fosse addirittura pari al 100%).

A conferma di questo promettente risultato sono seguiti diversi studi che hanno tuttavia riportato risultati contrastanti: in particolar modo Tan KL et al. hanno dimostrato, in uno studio retrospettivo eseguito su un'ampia popolazione di pazienti affetti da Linfoma di Hodgkin classico in stadio avanzato, una significativa correlazione tra l'aumentata espressione di CD68 e CD163 e una minore sopravvivenza ¹¹⁷. Simili risultati sono stati confermati anche da altri recenti studi ¹¹⁸⁻¹²².

I lavori di Sanchez-Esperidion ¹²³ e di Azambuja ¹²⁴ sono stati i primi studi a non confermare una correlazione statisticamente significativa tra la quota di infiltrato macrofagico, determinata tramite gli anticorpi antiCD68 e antiCD163, e l'outcome clinico dei pazienti in termini di sopravvivenza. Dati più recenti ottenuti su casistiche omogenee per trattamento sembrano confermare queste osservazioni ^{125,126}.

Agur A. et al avrebbero invece dimostrato una correlazione tra la quota di macrofagi CD68+ e le dimensioni della massa neoplastica iniziale e residua alla fine del trattamento, a suggerire una influenza dei macrofagi nello sviluppo della malattia mediante il microambiente ¹²⁷.

Anche la nostra esperienza sembra non mettere in evidenza nessun rapporto tra l'infiltrato macrofagico peritumorale e l'outcome dei pazienti. Sono seguiti più di recente

I TAM sembrano avere un ruolo fondamentale nella progressione tumorale modulando il sistema immune, l'angiogenesi e la metastatizzazione cellulare ^{121,128,129}.

Recenti dati di letteratura hanno dimostrato che i TAM producono VEGF-A, un fattore di crescita per l'endotelio vascolare, e Metalloproteinasi di Matrice 9 (MMP9), che facilita la liberazione del VEGF dalla matrice extracellulare ^{130,131}, promuovendo quindi l'angiogenesi. Dati di letteratura mostrano che CD105 (Endoglina), una proteina ipossia-inducibile, parte integrante del complesso di proteine del recettore per il TGF- β , è abbondantemente espressa sulle cellule endoteliali dei neovasi dei tessuti tumorali, inoltre, la densità di questa a livello dei tessuti affetti (MVD, Intratumoral microvessel density), determinata utilizzando anticorpi anti CD105, è stata identificata essere un fattore prognostico indipendente in termini di sopravvivenza in alcune neoplasie solide ¹³²⁻¹³⁴. Ribatti ¹³⁵ ha poi riportato l'esistenza di una correlazione tra la MVD (Micro Vessel Density) e il comportamento biologico dei linfomi B nodali, e in particolare un aumento della crescita del microcircolo tissutale al momento della progressione nei linfomi non Hodgkin. Per questo motivo, nel nostro studio, si è deciso di valutare la presenza di un'eventuale associazione, nell'ambito dei Linfomi di Hodgkin, tra la MVD e la recidiva/progressione di malattia utilizzando per la prima volta l'anticorpo anti CD105. Anche in questo caso non sono emerse correlazioni statisticamente significative tra l'angiogenesi e il numero di recidive/progressioni osservate.

I macrofagi associati al tumore (TAM) derivano dai monociti circolanti e sono reclutati nella sede del tumore da fattori di chemiotassi secreti dalla neoplasia stessa.

I linfociti infiltranti il tumore sono stati inoltre associati all'outcome dei pazienti con Linfoma di Hodgkin ¹³⁶ mentre la linfopenia, definita dallo score di Hasenclever come una quota di linfociti < 8% della conta cellulare totale o come <600 cellule / μ l, ha un ruolo prognostico sfavorevole.

Porrata et al. hanno messo in relazione il rapporto tra la conta assoluta linfocitaria (ALC, parametro che riflette lo stato immunitario del paziente) e la conta assoluta monocitica (AMC, parametro che riflette il microambiente tumorale) al momento della diagnosi con l'outcome clinico dei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin classico ¹³⁷. Lo studio ha dimostrato che:

- i pazienti con una AMC \geq 900 cellule/ μ L hanno una sopravvivenza inferiore rispetto a quelli con una quota inferiore di monociti in periferia,
- l'ALC non ha influenza solamente sull'overall survival (OS) e sulla freedom from progression (FFP), come dimostrato dallo studio di Hasenclever, ma anche sulla progression free survival (PFS) e lymphoma specific survival (LSS),
- un rapporto ALC/AMC \geq 1,1 è correlato ad una maggior OS, LSS, PFS e time to progression in tutti gli stadi di malattia (sia limitati che avanzati).

Un secondo studio di tipo retrospettivo ¹¹⁹ ha preso in considerazione il possibile ruolo prognostico del rapporto ALC/AMC e ha inoltre valutato la correlazione tra lo stesso e la percentuale di TAM CD68+ (clone Kp1, mouse monoclonal, 1:2000 diluition; Dako, Glostrup, Denmark) e CD163+ (clone10D6, mouse monoclonal, 1:400 diluition; Novocastra, Newcastle, U.K.) in 312 pazienti affetti da linfoma di Hodgkin classico, valutandone gli outcome dopo cinque anni dalla diagnosi. Lo studio ha evidenziato come:

- un ALC/AMC < 2,9 fosse significativamente correlato ad uno stadio più avanzato di malattia, alla presenza di sintomi B, a livelli più bassi di albumina ed emoglobina e ad una maggior quantità di macrofagi CD163+ nella biopsia diagnostica,

- un $ALC/AMC < 2,9$ fosse significativamente correlato, ma solo nei pazienti in stadio limitato, ad una minor Overall Survival.
- vi fosse una correlazione positiva tra la quota di macrofagi CD68+ e CD163+ nei tessuti affetti da linfoma e la percentuale di monociti nel sangue periferico, ma una correlazione negativa tra il rapporto ALC/AMC e la quota tissutale di CD163.

Ulteriori recenti studi hanno confermato il ruolo prognostico del rapporto linfociti/monociti alla diagnosi, anche se con riferimento a casistiche disomogenee¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Anche nel nostro lavoro emerge un rapporto statisticamente significativo tra il rapporto ALC/AMC e lo stadio di presentazione alla diagnosi, non si evidenzia, invece, alcuna relazione tra ALC/AMC ed EFS.

Infine anche nel nostro studio si conferma la differenza in termini di PFS tra i pazienti con PET 2 negativa e quelli con PET 2 positiva quando trattati con lo schema ABVD.

Nonostante la popolazione analizzata abbia una numerosità inferiore rispetto agli unici 2 lavori attualmente pubblicati sull'argomento, la nostra casistica fa riferimento ad un gruppo più omogeneo di pazienti raccolti in un intervallo di tempo più limitato con minore variabilità in termini di diagnosi istologica, di esami di stadiazione (TC e PET) e di trattamenti ricevuti dai pazienti.

7. CONCLUSIONI

Il nostro studio ha avuto lo scopo di valutare il ruolo prognostico di AMC e ALC/AMC ratio in termini di Event Free Survival in una popolazione consecutiva di pazienti affetti da Linfoma di Hodgkin, diagnosticata e trattata dal 1 Gennaio 2004 al 1 Aprile 2015 presso l'Istituto Oncologico Veneto.

Dai nostri risultati non sono emerse correlazioni statisticamente significative tra la conta linfocitaria e monocitaria assoluta al momento della diagnosi (ALC e AMC), il rapporto tra le due (ALC/AMC) e la EFS dei pazienti.

Allo stesso modo non si è evidenziata alcuna associazione tra ALC e AMC e lo stadio di presentazione di malattia.

I nostri dati mostrano invece l'esistenza di una possibile correlazione tra il valore del rapporto ALC/AMC al momento della diagnosi e lo stadio di presentazione di malattia: in particolare i pazienti con stadio limitato di malattia mostrano valori più elevati di ALC/AMC rispetto a quelli con stadio avanzato. Questo dato potrebbe indicare come i pazienti con malattia avanzata presentino una maggiore quantità di monociti nel sangue periferico, espressione dell'infiltrato macrofagico della neoplasia, e una minore quantità di linfociti, come già dimostrato da Hasenclever, espressione questa di uno stato immunitario difettivo.

Lo studio non ha evidenziato alcuna correlazione statisticamente significativa tra il numero di macrofagi CD68+ e l'outcome clinico dei pazienti affetti da linfoma di Hodgkin classico. Ugualmente, non è emersa un'associazione statisticamente significativa tra il numero di macrofagi CD68+ e lo stadio di presentazione di malattia.

Il nostro lavoro non ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa tra la MVD, valutata tramite la proteina Endogлина, lo stadio di presentazione di malattia e l'outcome dei pazienti.

Anche dalla nostra casistica emerge l'impatto prognostico della interim PET in termini di PFS durante il trattamento con lo schema ABVD.

Un limite del nostro lavoro è rappresentato dalla numerosità della casistica che non ci permette di escludere completamente l'assenza di correlazioni tra la EFS e i parametri umorali analizzati, così come tra il numero di eventi osservati e i dati immunostochimici.

Infine la percentuale di infiltrato macrofagico potrebbe essere meglio caratterizzata combinando all'anticorpo anti CD68, l'anticorpo rivolto contro l'antigene CD163^{141,142}, come descritto in letteratura, aumentando così la specificità della determinazione.

8.BIBLIOGRAFIA

1. Landgren O, Caporaso NE. New aspects in descriptive, etiologic, and molecular epidemiology of hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2007;21(5):825-840.
2. Klimm B, Diehl V, Engert A. [Hodgkin's disease]. *Rev Med Suisse.* 2005 Dec 7;1(44):2872-7.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM GLOBOCAN. Cancer incidence and mortality worldwide. *IARC CancerBase No. 10.* 2008 v1.2.
4. Salati M, Cesaretti M1, Macchia M1, Mistiri ME2, Federico M1. Epidemiological overview of hodgkin lymphoma across the mediterranean basin. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2014 Jul 1;6(1):e2014048.
5. Miller RW. International symposium on hodgkin's disease. session 4. small group workshops. report on workshop: Epidemiology, virology, and immunology. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1973 May;36:351-2.
6. Mueller N, Evans A, Harris NL, Comstock GW, Jellum E, Magnus K, Orentreich N, Polk BF, Vogelmann J. Hodgkin's disease and epstein-barr virus. altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med.* 1989 Mar 16;320(11):689-95.

7. Weiss LM, Chen YY, Liu XF, Shibata D. Epstein-barr virus and hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol.* 1991 Dec;139(6):1259-65.
8. Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, Ambinder RF, Jarrett RF, Brousset P, Pallesen G, Gulley ML, Khan G, O'Grady J, Hummel M, Preciado MV, Knecht H, Chan JK, Claviez A. Epstein-barr virus-associated hodgkin's disease: Epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer.* 1997 Feb 7;70(4):375-82.
9. Alexander FE, Jarrett RF, Lawrence D, Armstrong AA, Freeland J, Gokhale DA, Kane E, Taylor GM, Wright DH, Cartwright RA. Risk factors for hodgkin's disease by epstein-barr virus (EBV) status: Prior infection by EBV and other agents. *Br J Cancer.* 2000 Mar;82(5):1117-21.
10. Sleckman BG, Mauch PM, Ambinder RF, Mann R, Pinkus GS, Kadin ME, Sherburne B, Perez-Atayde A, Thior I, Mueller N. Epstein-barr virus in hodgkin's disease: Correlation of risk factors and disease characteristics with molecular evidence of viral infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Dec;7(12):1117-21.
11. Benharroch D, shemer-avni Y, levy A, myint YY, ariad S, rager B, sacks M, gopas. New candidate virus in association with hodgkin's disease. *J. leuk lymphoma.* 2003 apr;44(4):605-10. review.
12. Biggar RJ, Jaffe ES, Goedert JJ, Chaturvedi A, Pfeiffer R, Engels EA. Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/AIDS. *Blood.* 2006 Dec 1;108(12):3786-91.

13. Mack TM, Cozen W, Shibata DK, Weiss LM, Nathwani BN, Hernandez AM, Taylor CR, Hamilton AS, Deapen DM, Rappaport EB. Concordance for hodgkin's disease in identical twins suggesting genetic susceptibility to the young-adult form of the disease. *N Engl J Med.* 1995 Feb 16;332(7):413-8.
14. Niens M, Jarrett RF, Hepkema B, Nolte IM, Diepstra A, Platteel M, Kouprie N, Delury CP, Gallagher A, Visser L, Poppema S, te Meerman GJ, van den Berg A. HLA-A*02 is associated with a reduced risk and HLA-A*01 with an increased risk of developing EBV+ hodgkin lymphoma. *Blood.* 2007 Nov 1;110(9):3310-5.
15. Karayalcin G, Behm FG, Gieser PW, Kung F, Weiner M, Tebbi CK, Ferree C, Marcus R, Constine L, Mendenhall NP, Chauvenet A, Murphy SB. Lymphocyte predominant hodgkin disease: Clinico-pathologic features and results of treatment--the pediatric oncology group experience. *Med Pediatr Oncol.* 1997 Dec;29(6):519-25.
16. Hansmann ML, Stein H, Fellbaum C, Hui PK, Parwaresch MR, Lennert K. Nodular paragranuloma can transform into high-grade malignant lymphoma of B type. *Hum Pathol.* 1989 Dec;20(12):1169-75.
17. Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, Sabattini E, Zinzani PL, Piccaluga PP, Pileri A Jr, Giunti M, Falini B, Bolis GB, Stein H. Hodgkin's lymphoma: The pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol.* 2002 Mar;55(3):162-76. Review.
18. Küppers R. Molecular biology of hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res.* 2002;84:277-312.

19. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML. Hodgkin disease: Hodgkin and reed-sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23):10962-6.
20. Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and reed-sternberg cells in hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*. 1996 Oct 1;184(4):1495-505.
21. Seitz V, Hummel M, Marafioti T, Anagnostopoulos I, Assaf C, Stein H. Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in reed-sternberg cells of classic hodgkin disease. *Blood*. 2000 May 15;95(10):3020-4.
22. Chan WC. Cellular origin of nodular lymphocyte-predominant hodgkin's lymphoma: Immunophenotypic and molecular studies. *Semin Hematol*. 1999 Jul;36(3):242-52.
23. Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, Foss HD, Falini B, Delsol G, Isaacson PG, Pileri S, Stein H. Origin of nodular lymphocyte-predominant hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med*. 1997 Aug 14;337(7):453-8.
24. Carbone A, Gloghini A, Gaidano G, Franceschi S, Capello D, Drexler HG, Falini B, Dalla-Favera R. Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies

distinct histogenetic subtypes of hodgkin's disease. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2220-8.

25. Greiner A, Tobollik S, Buettner M, Jungnickel B, Herrmann K, Kremmer E, Niedobitek G. Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical hodgkin lymphoma. *J Pathol*. 2005 Apr;205(5):541-7.

26. Re D, Küppers R, Diehl V. Molecular pathogenesis of hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 10;23(26):6379-86.

27. Bräuninger A, Schmitz R, Bechtel D, Renné C, Hansmann ML, Küppers R. Molecular biology of hodgkin's and Reed/Sternberg cells in hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. 2006 Apr 15;118(8):1853-61.

28. Skinnider BF MT. The role of cytokines in classical hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4283-97. Review.

29. Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of hodgkin lymphoma marshall NA, *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1755-62.

30. Hsu SM, Lin J, Xie SS, Hsu PL, Rich S. Abundant expression of transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 by hodgkin's reed-sternberg cells and by reactive T lymphocytes in hodgkin's disease. *Hum Pathol*. 1993 Mar;24(3):249-55.

31. Martin D. Abeloff, MD, James O. Armitage, MD, John E. Niederhuber, MD, Michael B. Kastan, MD, PhD and W. Gillies McKenna, MD, PhD: Hodgkin's

Lymphoma. In: *Clinical Oncology*, eds Churchill Livingstone Publ, 2008, pp 2353-2369 .

32. Guermazi A, Brice P, de Kerviler E E, Fermé C, Hennequin C, Meignin V, Frija J. Extranodal hodgkin disease: spectrum of disease. *Radiographics*. 2001 Jan-Feb;21(1):161-79.

33. Gallamini A, Hutchings M, Rigacci L, Specht L, Merli F, Hansen M, Patti C, Loft A, Di Raimondo F, D'Amore F, Biggi A, Vitolo U, Stelitano C, Sancetta R, Trentin L, Luminari S, Iannitto E, Viviani S, Pierri I, Levis A. Early interim 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography is prognostically superior to international prognostic score in advanced-stage hodgkin's lymphoma: A report from a joint italian-danish study. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 20;25(24):3746-52.

34. Gallamini A, Rigacci L, Merli F, Nassi L, Bosi A, Capodanno I, Luminari S, Vitolo U, Sancetta R, Iannitto E, Trentin L, Stelitano C, Tavera S, Biggi A, Castagnoli A, Versari A, Gregianin M, Pelosi E, Torchio P, Levis A. The predictive value of positron emission tomography scanning performed after two courses of standard therapy on treatment outcome in advanced stage hodgkin's disease. *Haematologica*. 2006 Apr;91(4):475-81.

35. van der Kaaij MA, Heutte N, Meijnders P, Abeilard-Lemoisson E, Spina M, Moser LC, Allgeier A, Meulemans B, Dubois B, Simons AH, Lugtenburg PJ, Aleman BM, Noordijk EM, Fermé C, Thomas J, Stamatoullas A, Fruchart C, Brice P, Gaillard I, Doorduijn JK, Sebban C, Smit WG, Bologna S, Roesink JM, Ong F, André MP, Raemaekers JM, Henry-Amar M, Kluin-Nelemans HC.

Parenthood in survivors of hodgkin lymphoma: An EORTC-GELA general population case-control study. *J Clin Oncol.* 2012 Nov 1;30(31):3854-63.

36. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol.* 1989 Nov;7(11):1630-6. Erratum in: *J Clin Oncol* 1990 Sep;8(9):1602.

37. Chen-Liang TH¹, Martin Santos T, Jerez A. *Am J Hematol.* 2015 Aug;90(8):686-90.

38. Engert A, Ballova V, Haverkamp H, Pfistner B, Josting A, Dühmke E, Müller-Hermelink K, Diehl V, German Hodgkin's Study Group. Hodgkin's lymphoma in elderly patients: A comprehensive retrospective analysis from the german hodgkin's study group. *J Clin Oncol.* 2005 Aug 1;23(22):5052

39. Hasenclever D DV. A prognostic score for advanced hodgkin's disease. international prognostic factors project on advanced hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1998 Nov 19;339(21):1506-14.

40. Henry-Amar M, Friedman S, Hayat M, Somers R, Meerwaldt JH, Carde P, Burgers JM, Thomas J, Monconduit M, Noordijk EM, et al. Erythrocyte sedimentation rate predicts early relapse and survival in early-stage hodgkin disease. the EORTC lymphoma cooperative group. *Ann Intern Med.* 1991 Mar 1;114(5):361-5.

41. Tubiana M, Henry-Amar M, Hayat M, Burgers M, Qasim M, Somers R, Sizoo W, Van der Schueren E. Prognostic significance of the number of involved areas in the early stages of hodgkin's disease. *Cancer*. 1984 Sep 1;54(5):885-94.
42. Yahalom J MP. The involved field is back: Issues in delineating the radiation field in hodgkin's disease. *Ann Oncol*. 2002;13 Suppl 1:79-83. Review. 2002.
43. Yahalom J. Omitting radiotherapy after attaining FDG PET-negative status following chemotherapy alone for hodgkin lymphoma: A randomized study caveat. *Leuk Lymphoma* 2007 Sep;48(9):1667-9. 2007.
44. Hoppe RT, Advani RH, Bierman PJ, Bloomfield CD, Buadi F, Djulgegovic B, Forero A, Gordon LI, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Kaminski MS, Love G, Maloney DG, Mauch PM, Moore JO, Schilder RJ, Weiss L, Winter JN, Yahalom J, Zelenetz AD, National Comprehensive Cancer Network. Hodgkin disease/lymphoma. clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2006 Mar;4(3):210-30. 2006.
45. Engert A, Schiller P, Josting A, Herrmann R, Koch P, Sieber M, Boissevain F, De Wit M, Mezger J, Duhmke E, Willich N, Muller RP, Schmidt BF, Renner H, Muller-Hermelink HK, Pfistner B, Wolf J, Hasenclever D, Loffler M, Diehl V, German Hodgkin's Lymphoma Study Group. Involved-field radiotherapy is equally effective and less toxic compared with extended-field radiotherapy after four cycles of chemotherapy in patients with early-stage unfavorable hodgkin's lymphoma: Results of the HD8 trial of the german hodgkin's lymphoma study group. *J Clin Oncol* 2003 Oct 1;21(19):3601-8 Epub 2003 Aug 11. 2003.

46. De Vita VT Jr, Hubbard SM, Longo DL. Treatment of hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1990;(10):19-28 Review. 1990.
47. Bonadonna G, Zucali R, Monfardini S et al.. Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine, and imidazole carboxamide versus MOPP. *Cancer* 1975 Jul;36(1):252-9.
48. Canellos GP. Current therapeutic strategies in hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1992 Sep;3 Suppl 4:67-8. 1992.
49. Diehl V. Chemotherapy or combined modality treatment: The optimal treatment for hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 2004 Jan 1;22(1):15-8.
50. Yahalom J, Ryu J, Straus DJ, Gaynor JJ, Myers J, Caravelli J, Clarkson BD, Fuks Z. Impact of adjuvant radiation on the patterns and rate of relapse in advanced-stage hodgkin's disease treated with alternating chemotherapy combinations. *J Clin Oncol* 1991 Dec;9(12):2193-201. 1991.
51. Fabian CJ, Mansfield CM, Dahlberg S, Jones SE, Miller TP, Van Slyck E, Grozea PN, Morrison FS, Coltman CA Jr, Fisher RI. Low-dose involved field radiation after chemotherapy in advanced hodgkin disease. A southwest oncology group randomized study. *Ann Intern Med* 1994 Jun 1;120(11):903-12. 1994.
52. Loeffler M, Brosteanu O, Hasenclever D, Sextro M, Assouline D, Bartolucci AA, Cassileth PA, Crowther D, Diehl V, Fisher RI, Hoppe RT, Jacobs P, Pater JL, Pavlovsky S, Thompson E, Wiernik P. Meta-analysis of chemotherapy versus combined modality treatment trials in hodgkin's disease. international database on hodgkin's disease overview study group. *J Clin Oncol* 1998 Mar;16(3):818-29. 1998.

53. Hancock SL HR. Long-term complications of treatment and causes of mortality after hodgkin's disease. *Semin Radiat Oncol* 1996 Jul;6(3):225-242. 1996.
54. Aisenberg AC. Problems in hodgkin's disease management. *Blood* 1999 Feb 1;93(3):761-79 Review. 1999.
55. Bartlett NL, Rosenberg SA, Hoppe RT, Hancock SL, Horning SJ. Brief chemotherapy, stanford V, and adjuvant radiotherapy for bulky or advanced-stage hodgkin's disease: A preliminary report. *J Clin Oncol* 1995 May;13(5):1080-8. 1995.
56. Aversa SM, Salvagno L, Sorarù M, Mazzarotto R, Boso C, Gaion F, Chiarion-Sileni V, De Franchis G, Favaretto AG, Crivellari G, Banna GL, Sotti G, Monfardini S. Stanford V regimen plus consolidative radiotherapy is an effective therapeutic program for bulky or advanced-stage hodgkin's disease. *Acta Haematol* 2004;112(3):141-7. 2004.
57. Advani RH¹, Hong F², Fisher RI² et al. Randomized Phase III Trial Comparing ABVD Plus Radiotherapy With the Stanford V Regimen in Patients With Stages I or II Locally Extensive, Bulky Mediastinal Hodgkin Lymphoma: A Subset Analysis of the North American Intergroup E2496 Trial. *J Clin Oncol* 2015 Jun 10;33(17):1936-42
58. Diehl V. Dose-escalation study for the treatment of hodgkin's disease. the german hodgkin study group (GHSg). *Ann Hematol* 1993 Mar;66(3):139-40 Review. 1993.

59. Diehl V, Franklin J, Hasenclever D, Tesch H, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Sieber M, Ruffer JU, Sextro M, Engert A, Wolf J, Hermann R, Holmer L, Stappert-Jahn U, Winnerlein-Trump E, Wulf G, Krause S, Glunz A, von Kalle K, Bischoff H, Haedicke C, Dühmke E, Georgii A, Loeffler M. BEACOPP: A new regimen for advanced hodgkin's disease. german hodgkin's lymphoma study group. *Ann Oncol* 1998;9 Suppl 5:S67-71 Review. 1998.

60. Diehl V, Franklin J, Pfreundschuh M, Lathan B, Paulus U, Hasenclever D, Tesch H, Herrmann R, Dörken B, Müller-Hermelink HK, Dühmke E, Loeffler M, German Hodgkin's Lymphoma Study Group. Standard and increased-dose BEACOPP chemotherapy compared with COPP-ABVD for advanced hodgkin's disease. *N Engl J Med* 2003 Jun 12;348(24):2386-95 Erratum in: *N Engl J Med* 2005 Aug 18;353(7):744. 2003.

61. Bauer K, Skoetz N, Monsef I, Engert A, Brillant C. Comparison of chemotherapy including escalated BEACOPP versus chemotherapy including ABVD for patients with early unfavourable or advanced stage hodgkin lymphoma. *Cochrane Database Syst Rev* 2011 Aug 10;(8)

62. Borchmann P, Haverkamp H, Diehl V 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 of the German Hodgkin Study Group. *J Clin Oncol*. 2011 Nov 10;29(32):4234-42

63. Engert A, Haverkamp H, Kobe C, Markova J, Renner C, Ho A, Zijlstra J, Král Z, Fuchs M, Hallek M, Kanz L, Döhner H, Dörken B, Engel N, Topp M, Klutmann S, Amthauer H, Bockisch A, Kluge R, Kratochwil C, Schober O, Greil

R, Andreesen R, Kneba M, Pfreundschuh M, Stein H, Eich HT, Müller RP, Dietlein M, Borchmann P, Diehl V, German Hodgkin Study Group, Swiss Group for Clinical Cancer Research, Arbeitsgemeinschaft Medikamentöse Tumortherapie. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage hodgkin's lymphoma (HD15 trial): A randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2012 May 12;379(9828):1791-9

64. Ballova V, Rüffer JU, Haverkamp H, Pfistner B, Müller-Hermelink HK, Dühmke E, Worst P, Wilhelmy M, Naumann R, Hentrich M, Eich HT, Josting A, Löffler M, Diehl V, Engert A. A prospectively randomized trial carried out by the german hodgkin study group (GHSg) for elderly patients with advanced hodgkin's disease comparing BEACOPP baseline and COPP-ABVD (study HD9elderly). *Ann Oncol* 2005 Jan;16(1):124-31. 2005.

65. Engert A, Diehl V, Franklin J, Lohri A, Dörken B, Ludwig WD, Koch P, Hänel M, Pfreundschuh M, Wilhelm M, Trümper L, Aulitzky WE, Bentz M, Rummel M, Sezer O, Müller-Hermelink HK, Hasenclever D, Löffler M. 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 Sep 20;27(27):4548-54.

66. Federico M, Luminari S, Iannitto E, Polimeno G, Marcheselli L, Montanini A, La Sala A, Merli F, Stelitano C, Pozzi S, Scalone R, Di Renzo N, Musto P, Baldini L, Cervetti G, Angrilli F, Mazza P, Brugiattelli M, Gobbi PG, HD2000 Gruppo Italiano per lo Studio dei Linfomi Trial. ABVD compared with BEACOPP compared with CEC for the initial treatment of patients with advanced

hodgkin's lymphoma: Results from the HD2000 gruppo italiano per lo studio dei linfomi trial. *J Clin Oncol* 2009 Feb 10;27(5):805-11

67. Viviani S, Zinzani PL, Rambaldi A, Brusamolino E, Levis A, Bonfante V, Vitolo U, Pulsoni A, Liberati AM, Specchia G, Valagussa P, Rossi A, Zaja F, Pogliani EM, Pregno P, Gotti M, Gallamini A, Rota Scalabrini D, Bonadonna G, Gianni AM, Michelangelo Foundation, Gruppo Italiano di Terapie Innovative nei Linfomi, Intergruppo Italiano Linfomi. ABVD versus BEACOPP for hodgkin's lymphoma when high-dose salvage is planned. *N Engl J Med* 2011 Jul 21;365(3):203-12..

68. Linch DC, Winfield D, Goldstone AH, Moir D, Hancock B, McMillan A, Chopra R, Milligan D, Hudson GV. Dose intensification with autologous bone-marrow transplantation in relapsed and resistant hodgkin's disease: Results of a BNLI randomised trial. *Lancet* 1993 Apr 24;341(8852):1051-4. 1993.

69. Schmitz N, Pfistner B, Sextro M, Sieber M, Carella AM, Haenel M, Boissevain F, Zschaber R, Müller P, Kirchner H, Lohri A, Decker S, Koch B, Hasenclever D, Goldstone AH, Diehl V, German Hodgkin's Lymphoma Study Group, Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Aggressive conventional chemotherapy compared with high-dose chemotherapy with autologous haemopoietic stem-cell transplantation for relapsed chemosensitive hodgkin's disease: A randomised trial. *Lancet* 2002 Jun 15;359(9323):2065-71. 2002.

70. Brice P, Bouabdallah R, Moreau P, Divine M, André M, Aoudjane M, Fleury J, Anglaret B, Baruchel A, Sensebe L, Colombat P. Prognostic factors for survival after high-dose therapy and autologous stem cell transplantation for patients with

relapsing hodgkin's disease: Analysis of 280 patients from the french registry.
société française de greffe de moëlle.
Bone Marrow Transplant 1997 Jul;20(1):21-6. 1997.

71. Peggs KS, Hunter A, Chopra R, Parker A, Mahendra P, Milligan D, Craddock C, Pettengell R, Dogan A, Thomson KJ, Morris EC, Hale G, Waldmann H, Goldstone AH, Linch DC, Mackinnon S. Clinical evidence of a graft-versus-hodgkin's-lymphoma effect after reduced-intensity allogeneic transplantation. *Lancet* 2005 Jun 4-10;365(9475):1934-41. 2005.

72. Todisco E, Castagna L, Sarina B, Mazza R, Anastasia A, Balzarotti M, Banna G, Tirelli U, Soligo D, Santoro A. Reduced-intensity allogeneic transplantation in patients with refractory or progressive hodgkin's disease after high-dose chemotherapy and autologous stem cell infusion. *Eur J Haematol* 2007 Apr;78(4):322-9. 2007.

73. Alvarez I, Sureda A, Caballero MD, Urbano-Ispizua A, Ribera JM, Canales M, García-Conde J, Sanz G, Arranz R, Bernal MT, de la Serna J, Díez JL, Moraleda JM, Rubió-Félix D, Xicoy B, Martínez C, Mateos MV, Sierra J. Nonmyeloablative stem cell transplantation is an effective therapy for refractory or relapsed hodgkin lymphoma: Results of a spanish prospective cooperative protocol. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006 Feb;12(2):172-83. 2006.

74. Younes A, Bartlett NL, Leonard JP, Kennedy DA, Lynch CM, Sievers EL, Forero-Torres A. Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *N Engl J Med* 2010 Nov 4;363(19):1812-21. 2010.

75. Moskowitz AJ, Hamlin PA Jr, Perales MA, Gerecitano J, Horwitz SM, Matasar MJ, Noy A, Palomba ML, Portlock CS, Straus DJ, Graustein T, Zelenetz AD, Moskowitz CH. Phase II study of bendamustine in relapsed and refractory hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol* 2013 Feb 1;31(4):456-60
76. Ansell SM¹ Lesokhin AM, Borrello I et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015 Jan 22;372(4):311-9
77. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, Lister TA Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 20;32(27):3059-68
78. Meignan M, Gallamini A, Haioun C, Polliack A. Report on the second international workshop on interim positron emission tomography in lymphoma held in menton, france, 8-9 april 2010. *Leuk Lymphoma*. 2010 Dec;51(12):2171-80. 2010.
79. Sieniawski M, Franklin J, Nogova L, Glossmann JP, Schober T, Nisters-Backes H, Diehl V, Josting A. Outcome of patients experiencing progression or relapse after primary treatment with two cycles of chemotherapy and radiotherapy for early-stage favorable hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2007 May 20;25(15):2000-5. 2007.
80. Dores GM, Metayer C, Curtis RE, Lynch CF, Clarke EA, Glimelius B, Storm H, Pukkala E, van Leeuwen FE, Holowaty EJ, Andersson M, Wiklund T, Joensuu T, van't Veer MB, Stovall M, Gospodarowicz M, Travis LB. Second malignant

neoplasms among long-term survivors of hodgkin's disease: A population-based evaluation over 25 years. *J Clin Oncol* 2002 Aug 15;20(16):3484-94. 2002.

81. Donaldson SS, Hancock SL, Hoppe RT. The janeway lecture. hodgkin's disease--finding the balance between cure and late effects. *Cancer J Sci Am* 1999 Nov-Dec;5(6):325-33 Review. 1999.

82. Mauch PM, Kalish LA, Marcus KC, Shulman LN, Krill E, Tarbell NJ, Silver B, Weinstein H, Come S, Canellos GP, Coleman CN. Long-term survival in hodgkin's disease relative impact of mortality, second tumors, infection, and cardiovascular disease. *Cancer J Sci Am* 1995 May-Jun;1(1):33-42. 1995.

83. Swerdlow AJ, Barber JA, Hudson GV, Cunningham D, Gupta RK, Hancock BW, Horwich A, Lister TA, Linch DC. Risk of second malignancy after hodgkin's disease in a collaborative british cohort: The relation to age at treatment. *J Clin Oncol* 2000 Feb;18(3):498-509. 2000.

84. Dores GM, Metayer C, Curtis RE, Lynch CF, Clarke EA, Glimelius B, Storm H, Pukkala E, van Leeuwen FE, Holowaty EJ, Andersson M, Wiklund T, Joensuu T, van't Veer MB, Stovall M, Gospodarowicz M, Travis LB. Second malignant neoplasms among long-term survivors of hodgkin's disease: A population-based evaluation over 25 years. *J Clin Oncol* 2002 Aug 15;20(16):3484-94. 2002.

85. Schonfeld SJ, Gilbert ES, Dores GM, Lynch CF, Hodgson DC, Hall P, Storm H, Andersen A, Pukkala E, Holowaty E, Kaijser M, Andersson M, Joensuu H, Fosså SD, Allan JM, Travis LB. Acute myeloid leukemia following hodgkin lymphoma: A population-based study of 35,511 patients. *J Natl Cancer Inst* 2006 Feb 1;98(3):215-8. 2006.

86. van Leeuwen FE, Klokman WJ, Hagenbeek A, Noyon R, van den Belt-Dusebout AW, van Kerkhoff EH, van Heerde P, Somers R. Second cancer risk following hodgkin's disease: A 20-year follow-up study. *J Clin Oncol* 1994 Feb;12(2):312-25. 1994.
87. Swerdlow AJ, Douglas AJ, Hudson GV, Hudson BV, Bennett MH, MacLennan KA. Risk of second primary cancers after hodgkin's disease by type of treatment: Analysis of 2846 patients in the british national lymphoma investigation. *BMJ* 1992 May 2;304(6835):1137-43. 1992.
88. Metayer C, Curtis RE, Vose J, Sobocinski KA, Horowitz MM, Bhatia S, Fay JW, Freytes CO, Goldstein SC, Herzig RH, Keating A, Miller CB, Nevill TJ, Pecora AL, Rizzo JD, Williams SF, Li CY, Travis LB, Weisdorf DJ. Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after autotransplantation for lymphoma: A multicenter case-control study. *Blood* 2003 Mar 1;101(5):2015-23. 2003.
89. van Leeuwen FE, Klokman WJ, Veer MB, Hagenbeek A, Krol AD, Vetter UA, Schaapveld M, van Heerde P, Burgers JM, Somers R, Aleman BM. Long-term risk of second malignancy in survivors of hodgkin's disease treated during adolescence or young adulthood. *J Clin Oncol* 2000 Feb;18(3):487-97. 2000.
90. Kaldor JM, Day NE, Clarke EA, Van Leeuwen FE, Henry-Amar M, Fiorentino MV, Bell J, Pedersen D, Band P, Assouline D, et al. Leukemia following hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1990 Jan 4;322(1):7-13. 1990.

91. Dores GM, Metayer C, Curtis RE, Lynch CF, Clarke EA, Glimelius B, Storm H, Pukkala E, van Leeuwen FE, Holowaty EJ, Andersson M, Wiklund T, Joensuu T, van't Veer MB, Stovall M, Gospodarowicz M, Travis LB. Second malignant neoplasms among long-term survivors of hodgkin's disease: A population-based evaluation over 25 years. *J Clin Oncol*. 2002 Aug 15;20(16):3484-94. 2002.
92. Andrieu JM, Ifrah N, Payen C, Fermanian J, Coscas Y, Flandrin G. Increased risk of secondary acute nonlymphocytic leukemia after extended-field radiation therapy combined with MOPP chemotherapy for hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1990 Jul;8(7):1148-54 Review. 1990.
93. Pedersen-Bjergaard J, Johansson B, Philip P. Translocation (3;21)(q26;q22) in therapy-related myelodysplasia following drugs targeting DNA-topoisomerase II combined with alkylating agents, and in myeloproliferative disorders undergoing spontaneous leukemic transformation. *Cancer Genet Cytogenet* 1994 Aug;76(1):50-5 Review. 1994.
94. DNA topoisomerase II inhibitors. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2000;76:175-344. 2000.
95. Rueffer U, Josting A, Franklin J, May M, Sieber M, Breuer K, Engert A, Diehl V, German Hodgkin's Lymphoma Study Group. Non-hodgkin's lymphoma after primary hodgkin's disease in the german hodgkin's lymphoma study group: Incidence, treatment, and prognosis. *J Clin Oncol* 2001 Apr 1;19(7):2026-32. 2001.

96. Brierley JD, Rathmell AJ, Gospodarowicz MK, Sutcliffe SB, Munro A, Tsang R, Pintilie M. Late effects of treatment for early-stage hodgkin's disease. *Br J Cancer* 1998 Apr;77(8):1300-10.
97. Tucker MA. Solid second cancers following hodgkin's disease. *hematol oncol clin north am.* 1993 apr;7(2):389-400. review. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993 Apr;7(2):389-400 Review. 1993. .
98. Hancock SL, Tucker MA, Hoppe RT. Breast cancer after treatment of hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 1993 Jan 6;85(1):25-31. 1993.
99. Lorigan P1, Radford J, Howell A, Thatcher N. Lung cancer after treatment for hodgkin's lymphoma: A systematic review. *Lancet Oncol* 2005 Oct;6(10):773-9. 2005.
100. Boivin JF, Hutchison GB, Zauber AG, Bernstein L, Davis FG, Michel RP, Zanke B, Tan CT, Fuller LM, Mauch P, et al. Incidence of second cancers in patients treated for hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 1995 May 17;87(10):732-41. 1995.
101. Hull MC, Morris CG, Pepine CJ, Mendenhall NP. Valvular dysfunction and carotid, subclavian, and coronary artery disease in survivors of hodgkin lymphoma treated with radiation therapy. *JAMA* 2003 Dec 3;290(21):2831-7. 2003.
102. Aleman BM, van den Belt-Dusebout AW, De Bruin ML, van 't Veer MB, Baaijens MH, de Boer JP, Hart AA, Klokmann WJ, Kuenen MA, Ouwens GM, Bartelink H, van Leeuwen FE. Late cardiotoxicity after treatment for hodgkin lymphoma. *Blood* 2007 Mar 1;109(5):1878-86 Epub 2006 Nov 21. 2007.

103. Heidenreich PA, Schnittger I, Strauss HW, Vagelos RH, Lee BK, Mariscal CS, Tate DJ, Horning SJ, Hoppe RT, Hancock SL. Screening for coronary artery disease after mediastinal irradiation for hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 2007 Jan 1;25(1):43-9. 2007.
104. Sleijfer S. Bleomycin-induced pneumonitis. *Chest* 2001 Aug;120(2):617-24 Review. 2001.
105. Martin WG, Ristow KM, Habermann TM, Colgan JP, Witzig TE, Ansell SM. Bleomycin pulmonary toxicity has a negative impact on the outcome of patients with hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2005 Oct 20;23(30):7614-20 . 2005.
106. Hancock SL, Cox RS, McDougall IR. Thyroid diseases after treatment of hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1991 Aug 29;325(9):599-605. 1991.
107. Constine LS, Donaldson SS, McDougall IR, Cox RS, Link MP, Kaplan HS. Thyroid dysfunction after radiotherapy in children with hodgkin's disease. *Cancer* 1984 Feb 15;53(4):878-83. 1984.
108. Hartmann S, Döring C, Jakobus C, Rengstl B, Newrzela S, Tousseyn T, Sagaert X, Ponzoni M, Facchetti F, de Wolf-Peeters C, Steidl C, Gascoyne R, Küppers R, Hansmann ML. Nodular lymphocyte predominant hodgkin lymphoma and T cell/histiocyte rich large B cell lymphoma--endpoints of a spectrum of one disease?. *PLoS One* 2013 Nov 11;8(11):e78812. 2013.
109. Eyre TA, King AJ, Hatton C, Collins GP. T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma--transformation of nodular lymphocyte predominant hodgkin lymphoma in the bone marrow. *Eur J Haematol* 2014 Jun;92(6):550-1. 2014.

110. Extermann M, Aapro M, Bernabei R, Cohen HJ, Droz JP, Lichtman S, Mor V, Monfardini S, Repetto L, Sørbye L, Topinkova E, Task Force on CGA of the International Society of Geriatric Oncology. Use of comprehensive geriatric assessment in older cancer patients: Recommendations from the task force on CGA of the international society of geriatric oncology (SIOG). *Crit Rev Oncol Hematol* 2005 Sep;55(3):241-52. 2005.

111. Extermann M HA. Comprehensive geriatric assessment for older patients with cancer. *J Clin Oncol* 2007 May 10;25(14):1824-31 Review. 2007.

112. Smardova L, Engert A, Haverkamp H, Raemakers J, Baars J, Pfistner B, Diehl V, Josting A. Successful mobilization of peripheral blood stem cells with the DHAP regimen (dexamethasone, cytarabine, cisplatin) plus granulocyte colony-stimulating factor in patients with relapsed hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 2005 Jul;46(7):1017-22. 2005.

113. Santoro A, Magagnoli M, Spina M Ifosfamide, gemcitabine and vinorelbine: a new induction regimen for refractory and relapsed Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2007 Jan;92(1):35-41.

114. Rodriguez J, Rodriguez MA, Fayad L, McLaughlin P, Swan F, Sarris A, Romaguera J, Andersson B, Cabanillas F, Hagemester FB. ASHAP: A regimen for cytoreduction of refractory or recurrent hodgkin's disease. *Blood* 1999 Jun 1;93(11):3632-6. 1999.

115. Steidl C, Lee T, Shah SP. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010 Mar 11;362(10):875-85. 2010.

116. Sánchez-Aguilera A, Montalbán C, de la Cueva P, Sánchez-Verde L, Morente MM, García-Cosío M, García-Laraña J, Bellas C, Provencio M, Romagosa V, de Sevilla AF, Menárguez J, Sabín P, Mestre MJ, Méndez M, Fresno MF, Nicolás C, Piris MA, García JF, Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group. Tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic hodgkin lymphoma. *Blood* 2006 Jul 15;108(2):662-8.
117. Tan KL, Scott DW, Hong F, Kahl BS, Fisher RI, Bartlett NL, Advani RH, Buckstein R, Rimsza LM, Connors JM, Steidl C, Gordon LI, Horning SJ, Gascoyne RD. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic hodgkin lymphoma: A correlative study from the E2496 intergroup trial. *Blood* 2012 Oct 18;120(16):3280-7. 2012.
118. Jakovic LR, Mihaljevic BS, Perunicic Jovanovic MD, Bogdanovic AD, Andjelic BM, Bumbasirevic VZ. The prognostic relevance of tumor associated macrophages in advanced stage classical hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2011 Oct;52(10):1913-9. 2011.
119. Koh YW, Kang HJ, Park C, Yoon DH, Kim S, Suh C, Go H, Kim JE, Kim CW, Huh J. The ratio of the absolute lymphocyte count to the absolute monocyte count is associated with prognosis in hodgkin's lymphoma: Correlation with tumor-associated macrophages. *Oncologist* 2012;17(6):871-8. 2012.
120. Deau B, Bachy E, Ribrag V, Delarue R, Rubio MT, Bosq J, Varet B, Brousse N, Hermine O, Canioni D. Macrophage, mast cell and T lymphocyte infiltrations are independent predictive biomarkers of primary refractoriness or early relapse in classical hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2013 Jan;54(1):41-5. 2013.

121. Panico L, Ronconi F, Lepore M, Tenneriello V, Cantore N, Dell'Angelo AC, Ferbo U, Ferrara F. Prognostic role of tumor-associated macrophages and angiogenesis in classical hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2013 Nov;54(11):2418-25. 2013.

122. Touati M¹, Delage-Corre M, Monteil J, Abraham J, Moreau S, Remenieras L, Gourin MP, Dmytruk N, Olivrie A, Turlure P, Girault S, Labrousse F, Preux PM, Jaccard A, Bordessoule D. CD68-positive tumor-associated macrophages predict unfavorable treatment outcomes in classical Hodgkin lymphoma in correlation with interim fluorodeoxyglucose-positron emission tomography assessment. *Leuk Lymphoma*. 2015 Feb;56(2):332-41

123. Sánchez-Espiridión B, Martín-Moreno AM, Montalbán C, Medeiros LJ, Vega F, Younes A, Piris MA, Garcia JF. Immunohistochemical markers for tumor associated macrophages and survival in advanced classical hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2012 Jul;97(7):1080-4. 2012.

124. Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, Lossos IS, Anderson MW, Morais JC, Spector N. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2012 Mar;23(3):736-42. 2012.

125. Emanuele Cencini, Alberto Fabbri, Luigi Rigacci, Stefano Lazzi, Guido Gini, Maria Christina Cox, Salvatrice Mancuso, Elisabetta Abruzzese, Sofia Kovalchuk, Gaia Goteri, Arianna Di Napoli, Roberto Bono, Stefano Fratoni, Simonetta Di Lollo, Alberto Bosi, Lorenzo Leoncini and Monica Bocchia Evaluation of the prognostic role of tumour-associated macrophages in newly diagnosed classical Hodgkin lymphoma and correlation with early FDG-PET assessment. *Hematol Oncol*. 2015 Aug 7

126. Kayal S, Mathur S, Karak AK, Kumar L, Sharma A, Bakhshi S, Raina V. CD68 tumor-associated macrophage marker is not prognostic of clinical outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2014 May;55(5)
127. Agur A, Amir G, Paltiel O, Klein M, Dann EJ, Goldschmidt H, Goldschmidt N. CD68 staining correlates with the size of residual mass but not with survival in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015 May;56(5):1315-9
128. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Vacca A. Macrophages and tumor angiogenesis. *Leukemia* 2007 Oct;21(10):2085-9. 2007.
129. Dirx AE1, Oude Egbrink MG, Wagstaff J, Griffioen AW. Monocyte/macrophage infiltration in tumors: Modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2006 Dec;80(6):1183-96. 2006.
130. Tsutsumi C, Sonoda KH, Egashira K, Qiao H, Hisatomi T, Nakao S, Ishibashi M, Charo IF, Sakamoto T, Murata T, Ishibashi T. The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J Leukoc Biol* 2003 Jul;74(1):25-32. 2003.
131. Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999 Aug;40(9):1891-8. 1999. .
132. Cwiklinska A, Sobstyl M, Kwasniewski W, Bednarek W. Microtissue density prognostic factor evaluation based on antigens CD34 and CD 105 in ovarian cancer patients. *Ann Agric Environ Med*. 2013;20(4):838-42. 2013.
133. Nikiteas NI, Tzanakis N, Theodoropoulos G, Atsaves V, Christoni Z, Karakitsos P, Lazaris AC, Papachristodoulou A, Klonaris C, Gazouli M. Vascular

endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2007;10(1):12-7. Epub 2007 Feb 23. 2007.

134. Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. Breast carcinoma: Vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 1999 Feb 15;59(4):856-61. 1999.

135. Ribatti D VA. Novel therapeutic approaches targeting vascular endothelial growth factor and its receptors in haematological malignancies. *Curr Cancer Drug Targets* 2005 Dec;5(8):573-8 Review. 2005.

136. Schreck S, Friebel D, Buettner M, Distel L, Grabenbauer G, Young LS, Niedobitek G. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 2009 Mar;27(1):31-9. 2009.

137. Porrata LF, Ristow K, Colgan JP, Habermann TM, Witzig TE, Inwards DJ, Ansell SM, Micallef IN, Johnston PB, Nowakowski GS, Thompson C, Markovic SN. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio at diagnosis and survival in classical hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2012 Feb;97(2):262-. 2012.

138. Tadmor T, Bari A, Marcheselli L, Sacchi S, Aviv A, Baldini L, Gobbi PG, Pozzi S, Ferri P, Cox MC, Cascavilla N, Iannitto E, Federico M, Polliack A. Absolute Monocyte Count and Lymphocyte-Monocyte Ratio Predict Outcome in Nodular Sclerosis Hodgkin Lymphoma: Evaluation Based on Data From 1450 Patients. *Mayo Clin Proc*. 2015 Jun;90(6):756-64

139. Koh YW, Jung SJ, Yoon DH, Suh C, Cha HJ, Go H, Kim JE, Kim CW, Huh J. The absolute lymphocyte to monocyte ratio is associated with poor prognosis in classical Hodgkin lymphoma patients younger than 60 years of age. *Hematol Oncol*. 2015 Sep;33(3):133-40

140. Jakovic LR, Mihaljevic BS, Andjelic BM, Bogdanovic AD, Perunicic Jovanovic MD, Babic DD, Bumbasirevic VZ. Prognostic value of lymphocyte/monocyte ratio in advanced Hodgkin lymphoma: correlation with International Prognostic Score and tumor associated macrophages. *Leuk Lymphoma*. 2016 Jan 4:1-9
141. Klein JL¹, Nguyen TT, Bien-Willner GA, Chen L, Foyil KV, Bartlett NL, Duncavage EJ, Hassan A, Frater JL, Kreisel F. CD163 immunohistochemistry is superior to CD68 in predicting outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2014 Mar;141(3):381-7.
142. Young Wha Koh, Chan-Sik Park, Dok Hyun Yoon, Cheolwon Suh, and Jooryung Huh²CD163 Expression Was Associated with Angiogenesis and Shortened Survival in Patients with Uniformly Treated Classical Hodgkin Lymphoma. *PLoS One*. 2014; 9(1)

9. PUBBLICAZIONI

Genetic risk of subsequent esophageal cancer in lymphoma and breast cancer long-term survival patients: a pilot study. Boldrin E, Rumiato E, Fassan M, Rugge M, Cagol M, **Marino D**, Chiarion-Sileni V, Ruol A, Gusella M, Pasini F, Amadori A, Saggiaro D. *Pharmacogenomics J*. 2015 Jun 9. doi: 10.1038/tpj.2015.41

Safety and Efficacy of Rituximab Plus Bendamustine in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients

Annalisa Arcari,¹ Annalisa Chiappella,² Vanessa Valenti,¹ Luca Zanlari,³ Monica Tani,⁴ Roberto Marasca,⁵ Maria Giuseppina Cabras,⁶ Renato Zambello,⁷ Michele Spina,⁸ Alberto Santagostino,⁹ Fiorella Ilariucci,¹⁰ Giuseppe Carli,¹¹ Pellegrino Musto,¹² Paolo Savini,¹³ **Dario Marino**,¹⁴ Francesco Ghio,¹⁵ Massimo Gentile,¹⁶ Maria Christina Cox,¹⁷ and Daniele Vallisa¹ *Leuk Lymphoma*. 2015 Dec 15:1-8

Antiviral treatment in patients with indolent B-cell lymphomas associated with HCV infection: a study of the Fondazione Italiana Linfomi: Luca Arcaini¹, Daniele Vallisa,² Sara Rattotti¹, Virginia Valeria Ferretti¹, Andrés José María Ferreri³, Patrizia Bernuzzi², Michele Merli⁴, Marzia Varettoni¹, Annalisa Chiappella⁵, Achille Ambrosetti⁶, Alessandra Tucci⁷, Chiara Rusconi⁸, Carlo Visco⁹, Michele Spina¹⁰, Giuseppina Cabras¹¹, Stefano Luminari¹², Marco Tucci¹³, Pellegrino Musto¹⁴, Marco Ladetto¹⁵, Francesco Merli¹⁶, Caterina Stelitano¹⁷, Alfonso d'Arco¹⁸, Luigi Rigacci¹⁹, Alessandro Levis²⁰, Davide Rossi²¹, Pierangelo Spedini²², Salvatrice Mancuso²³, **Dario Marino**²⁴, Raffaele Bruno²⁵, Luca Baldini²⁶, Alessandro Pulsoni² *Ann Oncol*, 2014 Jul;25(7):1404-10.

Integrazione assistenziale tra ospedale e territorio., Schiavon S, Michielotto M, Brunello A, Crivellari G, Galiano A, Guglieri I, Lonardi S, **Marino D**, Nardi MT, Trentin L, Zagonel V.

XXII Congresso SICP, Sorrento 4-7 Novembre 2015. Sessione Poster

Trattamento radiante in pazienti con linfoma primitivo dell'orbita: esperienza di un singolo centro su 75 pazienti. C. Boso, V. De Carolis, B. El Khouzai, **D. Marino**, S. Finotto, R. Parrozzani, E. Mideni, F. Marino, F. Vianello *AIRO 2015 7-10 Novembre Poster session*

Multidisciplinary simultaneous care service of Istituto Oncologico Veneto (IOV) ESMO-DC: an experience of early integration between oncologic treatment and palliative care

Galiano A, Guglieri I, Schiavon S, Nardi MT, Michielotto M, **Marino D**, Bolshinski M, Vernaci G, Capovilla E, Trentin L, Zagonel V *Poster ESMO 2015*

Linfoma primitivo della tiroide: esperienza di un singolo istituto C. Boso*, **D. Marino** **, AM. Tisato*, A. Ennadir*, F. Gregucci*, MR. Pellizzo°, F. Vianello* * U.O. Radioterapia e Medicina Nucleare, Istituto Oncologico Veneto – IRCCS, Padova ** U.O. Oncologia Medica 1, Istituto Oncologico Veneto – IRCCS, Padova° Clinica Chirurgica 2°, Università degli Studi di Padova. *Poster AIRO 2014*