

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Dottorato di Ricerca in
Ematologia Clinica e Sperimentale ed Ematopatologia
Ciclo XXI

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: Med08

PROFILO MOLECOLARE DEI LINFOMI POST-TRAPIANTO

Presentata da: Dr.ssa Cristina Campidelli

Coordinatore del Dottorato
Chiar.mo Prof. Stefano A. Pileri

Relatore
Chiar.mo Prof. Stefano A. Pileri

Esame finale anno 2009

Indice

1.Introduzione.....	1
1.1 Caratteri generali dei PTLD.....	1
1.2 Epidemiologia.....	2
1.2.1 tipo di trapianto.....	3
1.2.2 regime immunosoppressivo.....	3
1.2.3 età al momento del trapianto.....	4
1.2.4 agenti virali.....	4
1.2.5 rigetto.....	4
1.2.6 polimorfismi dei geni codificanti per le citochine.....	4
1.3 Eziologia ed istogenesi.....	5
1.3.1 agenti infettivi virali.....	6
1.3.2 mutazioni geniche.....	8
1.4 Presentazione clinica.....	9
1.5 Classificazione istopatologia.....	10
1.5.1 lesioni precoci.....	10
1.5.2 PTLD polimorfi.....	11
1.5.3 PTLD monomorfi.....	12
1.5.4 PTLD tipo linfoma di Hodgkin classico.....	17
1.6 Diagnosi di PTLD.....	17
1.7 Profilassi.....	18
1.7.1 vaccinazione per EBV.....	18
1.7.2 farmaci anti-virali.....	18
1.7.3 “pre-emptive” therapy.....	19
1.8 Terapia.....	19
1.8.1 riduzione dell’immunosoppressione.....	20
1.8.2 chemioterapia.....	20
1.8.3 anticorpi monoclonali.....	21
1.8.4 farmaci modulanti i livelli citochinici.....	21
1.8.5 rapamicina, sirolimus ed everolimus.....	22
1.8.6 linfociti T-citotossici EBV specifici.....	22
1.8.7 terapia dei PTLD del sistema nervoso centrale.....	23
2. Scopo dello studio.....	24
3. Materiali e metodi.....	25
3.1 casistica.....	25
3.2 istologia e allestimento del TMA.....	25
3.3 immunoistochimica.....	25
3.4 ibridazione <i>in situ</i>	26

4. Risultati.....	27
4.1 dati clinici.....	27
4.2 istologia e immunoistochimica.....	28
4.3 ibridazione <i>in situ</i>	29
5. Discussione.....	30
6. Tabelle e figure.....	37
7. Bibliografia.....	41

1. Introduzione

1.1 Caratteri generali dei PTLD

I disordini linfo-proliferativi post-trapianto (PTLD sec. WHO) sono proliferazioni di natura linfoide o plasmacitica, che si sviluppano in pazienti sottoposti ad un trapianto di organo solido (TOS) o di midollo osseo allogenico (allo-TMO), quale conseguenza dello stato di immunodepressione indotto nel paziente al fine di evitare il rigetto d'organo o una malattia da reazione contro l'ospite (GVHD)¹. I PTLD comprendono un ampio spettro di situazioni patologiche che spaziano da proliferazioni benigne simil-mononucleosiche a neoplasie linfoidi sostanzialmente indistinguibili dai linfomi non-Hodgkin (LNH) di natura B o T-cellulare che insorgono in pazienti immunocompetenti. Tipicamente la maggior parte dei PTLD mostra integrazione del virus di Epstein-Barr (EBV), che sembra svolgere il principale ruolo eziopatogenetico^{2,3,4,5,6,7}. Da un punto di vista istopatologico, i PTLD sono suddivisi in quattro categorie (sec. WHO, 2008): 1) *lesioni precoci* (comprendenti l'iperplasia plasmacitica reattiva e i disordini simil-mononucleosici), 2) *PTLD polimorfi* (P-PTLD), 3) *PTLD monomorfi B o T-cellulari* (M-PTLD), 4) *PTLD tipo Linfoma di Hodgkin classico*. Le lesioni monomorfe e le lesioni tipo Hodgkin sono veri e propri linfomi, per i quali vale la caratterizzazione in sottogruppi istopatologici che si applica ai loro corrispettivi ad insorgenza nel paziente immunocompetente¹. La popolazione cellulare che costituisce i PTLD origina più frequentemente dai linfociti del ricevente il caso di TOS, mentre in caso di allo-TMO le cellule coinvolte derivano prevalentemente dal sistema immunitario del donatore. Per quel che concerne l'istotipo, le lesioni sono costituite da linfociti B nell'85% dei casi (di cui l'80% è EBV-correlato) e da linfociti T/NK nel restante 10-15% (dei quali solo il 30% risulta EBV-positivo)⁸. I PTLD si distinguono secondo un criterio temporale in *PTLD ad esordio precoce*, nel caso in cui insorgano entro i primi 12 mesi dal trapianto e *PTLD ad esordio tardivo*, se si manifestano oltre tale termine. Le forme ad esordio precoce sono le più frequenti. I soggetti colpiti hanno un'età media (≤ 25 anni) inferiore ai casi ad esordio tardivo ed usualmente presentano un'infezione da EBV in forma attiva; le lesioni sono prevalentemente policlonali e spesso regrediscono con la sola diminuzione o interruzione della terapia immunosoppressiva. Le forme tardive presentano caratteristiche differenti: i pazienti hanno un'età media più elevata, le lesioni sono monomorfe e correlate con un'infezione da EBV con minor frequenza; la sola

riduzione dell'immunosoppressione, infine, non è efficace nell'indurne la regressione e sono necessarie chemioterapie ad alte dosi associate o meno all'utilizzo di anticorpi monoclonali (immunoterapia)

1.2 Epidemiologia

L'insorgenza di linfomi nel paziente immunocompromesso è stata descritta per la prima volta nel 1968⁹, e solo successivamente è stato evidenziato lo stretto legame con l'infezione da EBV¹⁰. I pazienti trapiantati più facilmente sviluppano neoplasie maligne, a causa dello stato di immunodepressione indotto: l'incidenza di questa complicanza varia dall'1% al 4%. Nei Paesi Occidentali le neoplasie di più frequente riscontro nel paziente adulto trapiantato sono: tumori cutanei, sarcoma di Kaposi e disordini linfoproliferativi¹¹; questi ultimi costituiscono la principale complicanza nei pazienti pediatrici. La mortalità complessiva si attesta circa sul 50%. Vari fattori di rischio sono stati identificati per lo sviluppo dei PTLD: tipo di organo trapiantato, regime immunosoppressivo, età del paziente, siero-conversione per EBV al momento del trapianto¹².

1.2.1 Tipo di trapianto

I pazienti con trapianto di rene presentano la minore probabilità di sviluppare un PTLD; rispetto alla popolazione generale l'incidenza è <1% ed il rischio relativo (RR) pari a 20^{13,14}. Il trapianto di fegato o di cuore presentano un rischio intermedio (incidenza 1-2%) mentre i trapianti combinati (cuore-polmone) o complessi (es. intestino) hanno il rischio maggiore (incidenza $\geq 5\%$, RR = 120)^{13,15,16,17}. L'incidenza totale di PTLD nei pazienti con TOS è < 2%¹⁸. Nel caso di TMO, il rischio di sviluppare un PTLD è minore (circa l'1%) rispetto ad un TOS, ma la probabilità di sviluppare un PTLD precoce aumenta nelle seguenti circostanze: Trapianto MUD (HLA-Matched Unrelated Donor) o da parente con profilo HLA scarsamente compatibile con il ricevente;

- a. Midollo osseo del donatore depleto in linfociti T;
- b. Trattamento con globulina anti-timocitica nel regime di induzione o nella prevenzione di una GVHD;
- c. Somministrazione di anticorpi monoclonali anti-CD3¹⁹.

Il rischio di sviluppare un disordine linfoproliferativo in questi pazienti supera il 22% se sono presenti due o più di tali fattori di rischio²⁰.

1.2..2 Regime immunosoppressivo

I PTLD insorgono come conseguenza dell'effetto di potenti agenti immunosoppressivi, necessari a prevenire il rigetto dell'organo trapiantato. L'effetto dei protocolli immunosoppressivi nello sviluppo dei PTLD è stato valutato da due principali studi di coorte. Liberty²¹ ha studiato un'ampia casistica comprendente 1537 soggetti sottoposti a trapianto di rene tra il 1976 e il 1998. Nell'arco dei 22 anni il regime immunosoppressivo è variato secondo tre differenti schemi: il protocollo in uso dal 1976 al 1983 comprendeva azatioprina e steroidi; quello dal 1984 al 1989 ciclosporina A (CsA), azatioprina e prednisone ("tripla terapia"); in quello più recente, applicato dal 1990 al 1998, Tacrolimus e micofenolato mofetile. Dallo studio emerge che solo un paziente trattato con azatioprina ha sviluppato un PTLD, mentre nei pazienti che avevano ricevuto la "tripla terapia" l'incidenza variava dallo 0.8%, al 2.3%. Nel secondo studio Gao²² hanno esaminato l'incidenza di PTLD in un gruppo di pazienti sottoposti a trapianto di cuore-polmoni in un intervallo di 30 anni. I pazienti sono stati suddivisi in 4 gruppi sulla base del regime immunosoppressivo applicato (gruppo 1: non CsA; gruppo 2: "tripla terapia"; gruppo 3 "tripla terapia" + OKT3 (un anticorpo monoclonale murino diretto contro il CD3); gruppo 4: Tacrolimus + micofenolato mofetile). In contrasto con quanto riportato da Liberty, Gao non ha rilevato differenze statisticamente significative nell'insorgenza di PTLD tra le 4 categorie. Tuttavia, differenti incidenze di malattia sembravano emergere nei pazienti trattati con CsA in relazione alla dose somministrata. In caso di alte dosi (>6.6 mg/kg/die nel primo mese post-trapianto) infatti l'incidenza risultava del 10.6%, rispetto ad un 5.6% dei pazienti ricevuti basse dosi. Altri studi retrospettivi, condotti su un numero più contenuto di partecipanti, suggeriscono che l'introduzione della CsA nello schema terapeutico sia associata ad un'aumentata incidenza dei PTLD^{23,24}. Il Tacrolimus è stato introdotto nei primi anni '90. Questo farmaco svolge un'azione simile a quella della CsA, ma con un'efficacia maggiore a parità di dose. Tuttavia diversi studi hanno sottolineato come l'uso del Tacrolimus rispetto alla CsA possa aumentare il rischio di sviluppare un PTLD nella popolazione pediatrica da 2 a 5 volte^{13,25,26,27}. Anche l'utilizzo dell'anticorpo monoclonale OKT3 nella terapia d'induzione o nel trattamento del rigetto acuto resistente agli steroidi è stato suggerito come possibile fattore di rischio. I primi studi condotti al riguardo hanno sottolineato che l'incidenza di PTLD saliva dall'1.3% all'11.4% e che l'incremento del rischio era da correlare alla dose cumulativa del

farmaco²⁸; le ultime analisi, condotte somministrando dosi cumulative di OKT3 più basse, indicherebbero invece un'incidenza di PTLD sostanzialmente invariata^{29,30}.

In generale, l'impatto dei farmaci immunosoppressivi sullo sviluppo dei PTLD sembra maggiormente legato al grado di immunosoppressione valutato su tutto il periodo della terapia che al tipo di farmaco impiegato.

1.2..3 Età al momento del trapianto

L'incidenza della patologia è significativamente più elevata nei pazienti pediatrici, con valori del 1.2-10.1% nei trapianti di rene, 4-15% in quelli di fegato e 6.4-19.5% in quelli di polmone, cuore e cuore-polmone⁸; nei pazienti con allo-TMO, uno studio multicentrico pediatrico indica un RR di 182, con valori massimi raggiunti nei primi 5 anni dal trapianto (RR=540 nel primo anno; RR=97 tra il secondo e il quinto anno)³¹. La spiegazione di un maggior impatto nella popolazione pediatrica è in larga misura da attribuire ad un'infezione da EBV dopo il trapianto; il virus infatti viene facilmente acquisito con l'organo trapiantato, nel caso di donatore EBV-positivo⁸.

1.2..4 Agenti virali

Uno stato di siero-negatività per l'EBV nel ricevente rispetto una siero-positività del donatore è un fattore di rischio noto (vedi paragrafo 1.3.1): questo spiegherebbe, almeno in parte, la maggiore incidenza di PTLD in pazienti pediatrici. Il Citomegalovirus (CMV), il virus erpetico umano 8 (HHV8) e il Simian Virus 40 (SV40) sono stati riscontrati in alcuni casi di PTLD e si pensa possano costituire un fattore di rischio (vedi paragrafo 1.3.1).

1.2..5 Rigetto

Episodi di rigetto, valutati per numero e severità, e malassortimento HLA tra donatore e ricevente sono considerati come possibili fattori di rischio, ma il loro ruolo è ancora oggetto di speculazione¹⁰.

1.2..6 Polimorfismi dei geni codificanti per le citochine

Le citochine sono proteine solubili prodotte soprattutto, ma non esclusivamente, dalle cellule leucocitarie. La regolazione dei livelli citochinici è sotto il controllo di geni provvisti di SNPs (Single Nucleotide Polimorphisms) posti sia in corrispondenza delle

sequenze di decodificazione che dei promotori. Alcuni studi evidenziano come SNPs dei geni codificanti per TGF- β e IL-10 costituiscano dei fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo di PTLD EBV-associati³². TGF- β è un potente immunosoppressore della proliferazione B-linfocitaria, inducendo l'apoptosi nelle cellule B immature e bloccando l'attivazione delle stesse. La sua produzione è controllata da uno SNP sito nella regione codificante e il genotipo "GG" (a livello del codone 25) è associato ad una maggiore espressione del prodotto proteico. Comparando la prevalenza tra casi e controlli questo genotipo assume il significato di fattore protettivo indipendente nello sviluppo di un PTLD³². L' IL-10 esercita un'azione antiflogistica inibendo le risposte immunitarie di tipo Th1 e ostacolando le funzioni dei monociti. Il genotipo "IL-10 (-1082) GG" è stato associato ad una maggiore espressione di questa citochina e conseguentemente lo rende un fattore protettivo nei confronti di un PTLD³¹.

1.3 Eziologia ed istogenesi

Gli studi molecolari hanno contribuito in modo significativo alla valutazione dell'eterogeneità delle neoplasie linfoidi in pazienti immunocompetenti ed immunocompromessi. Negli ultimi anni la comprensione del meccanismo linfomagenico ha ricevuto impulso grazie all'introduzione di marcatori istogenetici che hanno consentito la distinzione della cellula B matura in linfocito B vergine, linfocito B del centro germinativo (CG) e linfocito post-CG. I marcatori genotipici dell'istogenesi B sono principalmente rappresentati dalle ipermutazioni somatiche della regione variabile dei geni che codificano per le catene pesanti delle immunoglobuline (IgVh), che si verificano nel corso delle reazioni immuni T-dipendenti che avvengono nel micro-ambiente del CG. In pratica la presenza di ipermutazioni somatiche in un linfoma indica che le cellule neoplastiche hanno un'origine CG o post-CG. In particolare, mutazioni cosiddette "ongoing" suggeriscono una derivazione centroblastica mentre l'assenza delle stesse una derivazione dal centrocita o da cellule B che hanno sperimentato il CG e ne stanno uscendo. Mutazioni del proto-oncogene BCL6 fisiologicamente presenti nei linfociti B durante il passaggio attraverso il CG costituiscono un ulteriore marcatore istogenetico. I marcatori fenotipici dell'istogenesi tumorale sono semplificati dalle molecole Bcl-6 (marcatore del CG), IRF-4 (marcatore post-CG) e CD138 (marcatore di differenziazione B pre-terminale o plasmacellulare)³³. Dall'applicazione dei suddetti marcatori si è quindi evidenziato che il 25% dei P-PTLD

e il 10% dei M-PTLD tipo linfoma B diffuso a grandi cellule sono privi di ipermutazioni somatiche, il che denota un'origine da linfociti B vergini. Il 100% dei linfomi di Burkitt e il 25% dei linfomi B diffusi a grandi cellule possiedono ipermutazioni somatiche "ongoing" suggerendo come cellula d'origine un centroblasto; infine, il 75% dei P-PTLD e il 65% dei linfomi B diffusi a grandi cellule contengono ipermutazioni somatiche stabili, indicando come progenitore un centrocita o una cellula che abbia oltrepassato il centro germinativo³⁴.

1.3..1 Agenti infettivi virali

I virus oncogenici coinvolti nella patogenesi dei PTLD sono l'EBV e l'HHV-8³⁵. I virus sfruttano diverse strategie per assicurare la persistenza dell'infezione, quali evitare la morte della cellula infettata, incrementare la proliferazione delle cellule ospiti per mantenere il proprio "reservoir" ed evadere il controllo del sistema immunitario. Il virus di Epstein-Barr svolge un ruolo di primo piano nella patogenesi dei PTLD e alcune evidenze supportano tale tesi:

- a. l'infezione da EBV è presente nel 60-80% dei PTLD, con particolare riguardo alle forme ad esordio precoce e nelle presentazioni tipo linfoma di Hodgkin classico;
- b. in molti casi di M-PTLD l'infezione è monoclonale, e ciò supporta l'ipotesi secondo la quale il virus possa essere integrato nella cellula tumorale fin dalle prime fasi di proliferazione clonale;
- c. i linfociti B EBV-positivi sono stati rilevati in quantità cospicue nel sangue e nei tessuti di pazienti che hanno successivamente sviluppato un PTLD;
- d. controllo della carica virale e riduzione delle dimensioni tumorali si verificano a seguito dell'infusione di linfociti T-citotossici EBV-specifici.

L'EBV è un gamma-herpesvirus isolato per la prima volta nel 1964 da Anthony Epstein, che lo identificò in colture cellulari ottenute da campioni bioptici di pazienti affetti da linfoma di Burkitt³⁶. Il 95% della popolazione generale contrae un'infezione da EBV in età pre-adolescenziale. In condizioni di immunocompetenza questa più spesso decorre in forma asintomatica o inducendo una sintomatologia simil-influenzale. In una minoranza di casi determina la mononucleosi infettiva, una proliferazione linfoide autolimitantesi della giovane età, caratterizzata da febbre, faringo-tonsillite, linfadenomegalie polidistrettuali e splenomegalia. Il virus infetta le cellule B naïve della zona mantellare del tessuto linfoide tonsillare. Sebbene una modesta percentuale

di linfociti B sia permissiva nei confronti della replicazione virale, la maggioranza delle cellule ospita il virus sotto forma di infezione latente. Dopo l'ingresso e l'integrazione con il DNA della cellula ospite, il virus inizia il ciclo replicativo attraverso tre programmi di trascrizione genica. Nella latenza di tipo III o "programma di crescita" sono espressi i geni di latenza: gli antigeni nucleari (EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C), le proteine latenti di membrana (LMP-1, 2A, 2B) e l'RNA virale poliadenilato (EBER1/2). Le proteine di latenza favoriscono la sopravvivenza e la proliferazione dei linfociti B infetti che, in condizioni di normalità, divengono il bersaglio di linfociti T-citotossici EBV-specifici. Nel programma di latenza di tipo II o "programma difettivo" si riduce l'espressione di EBNA2, mentre LMP1 e 2 favoriscono la maturazione B-linfocitaria a cellule di memoria e la loro immortalizzazione. Infine, il programma di latenza di tipo I consente alla cellula ospite di evadere il controllo dei linfociti T-citotossici. Gli Herpesvirus sono particolarmente abili nell'evadere la risposta immunitaria; grazie all'omologia con il DNA umano, che ne favorisce la perfetta integrazione, il virus è in grado di trascrivere geni utili alla sua replicazione e sopravvivenza, contribuendo in tal senso alla trasformazione tumorale della cellula che lo ospita. E' noto come l'EBV risulti essere l'agente causale, oltre che dei PTLD, del linfoma di Burkitt, del linfoma di Hodgkin classico e del carcinoma indifferenziato del rinofaringe³⁷.

I PTLD EBV-negativi, al contrario, sottostanno a meccanismi eziopatogenetici diversi. Swerdlow e colleghi³⁵ propongono diverse ipotesi.

- a. Essi potrebbero derivare da cellule EBV-trasformate, ma che successivamente perdono tutto o parte del genoma virale;
- b. Altri agenti infettivi implicati, favoriti dal contesto di immunosoppressione. Tra questi vanno annoverati HHV-8 associato a rari casi di PTLD e HHV-6 con un unico caso descritto in letteratura. L'HHV-8 è costantemente coinvolto nel linfoma primitivo delle cavità sierose (PEL-primary effusion lymphoma, sec WHO)³⁸. Clinicamente si presenta come un linfoma a crescita prevalentemente liquida, coinvolgente la pleura, il peritoneo e il pericardio. In maniera non dissimile dall'EBV, l'HHV-8 stabilisce un'infezione latente permanente dell'ospite, nel corso della quale il DNA virale persiste in forma episomica nel nucleo della cellula ospite³⁹. I geni virali condividono omologie di sequenza con numerosi geni umani (geni codificanti per le citochine, geni coinvolti nella proliferazione cellulare, nei processi anti-apoptotici e nell'angiogenesi) e sono

dotati di capacità trasformanti. Ancora materia di dibattito resta il contributo del SV40 nella patogenesi dei PTLD. Sebbene due studi dimostrino un'alta prevalenza dell'agente patogeno nei LNH, tra cui anche le forme correlate a stati di immunodeficienza^{40,41}, l'associazione tra SV40 e linfoma è stata successivamente smentita da ricerche più recenti, condotte a livello molecolare, immunoistochimico e sierologico^{42,43};

c. Stimolazione antigenica cronica, sul modello patogenetico del linfoma B marginale extranodale, tipo MALT, correlato all'*Helicobacter pylori*.

1.3..2 Mutazioni geniche

Nella patogenesi dei PTLD, l'infezione da parte di un virus oncogeno è considerata una condizione spesso necessaria, ma non sufficiente, per l'insorgenza di un linfoma. La malattia linfomatosa è, infatti, l'esito finale di una serie di mutazioni a carico del DNA cellulare³⁴. Alcuni PTLD presentano notevole instabilità micro satellitare favorita da alterazioni dei geni codificanti per il complesso del *DNA Mismatch Repair* (deputati alla correzione degli errori di appaiamento tra le basi azotate durante la replicazione del DNA) oltre che un'alta frequenza di mutazioni a carico di geni pro-apoptocici come BAX, CASPASI-5, e RAD50, codificante per un fattore di riparazione del DNA. Altre mutazioni ricorrenti colpiscono i seguenti geni:

MYC: i linfomi di Burkitt post-trapianto, analogamente alle varianti endemica, sporadica o HIV-relata, sono caratterizzati dalla presenza di t(8;14). Questa traslocazione giustappone il proto-oncogene MYC (cromosoma 8) al promotore del gene codificante per le catene pesanti delle Ig (cromosoma 14). La de-regolazione che ne consegue incrementa l'espressione di geni coinvolti nella replicazione cellulare e diminuisce la trascrizione di altri con funzione pro-apototica; l'esito finale è una crescita cellulare incontrollata e lo sviluppo della massa tumorale.

BCL-6: codifica per un fattore trascrizionale contenente un dominio POZ (Poxvirus zinc finger) amino-terminale che agisce come un repressore trascrizionale sequenza-specifico. BCL-6 è necessario per lo sviluppo e la sopravvivenza dei linfociti B del centro germinativo. La traslocazione di BCL-6 si osserva nel 20-40% dei linfomi B diffusi a grandi cellule (popolazione generale e pazienti HIV+), ma è di rara osservazione nei PTLD. Al contrario, in circa la metà dei PTLD, il gene presenta

numerose mutazioni a carico della regione non-codificante 5', in vicinanza del promotore.

TP53 : p53 (prodotto genico) è un fattore di trascrizione che regola il ciclo cellulare e ricopre la funzione di soppressore tumorale. Mutazioni a suo carico sono state rilevate in un sottogruppo di M-PTLD, a tipo di linfoma B diffuso a grandi cellule⁶.

Ipermetilazione del DNA: il processo consiste nel legame di un gruppo metile (-CH₃) ad una base azotata. L'ipermetilazione aberrante reprime la trascrizione genica, rappresenta un ulteriore meccanismo di inattivazione dei geni oncosoppressori e svolge un ruolo significativo nella genesi dei linfomi nei pazienti trapiantati. Ad esempio, l'ipermetilazione del gene della O₆-metilguanina-DNA metiltransferasi (MGMT), normalmente coinvolto nei processi di riparazione⁴⁴, è presente nel 60% dei M-PTLD. L'ipermetilazione/inattivazione di *DAP-k* (serina/treonina-chinasi con proprietà pro-apoptotiche coinvolta nel programma di morte cellulare innescata da IFN- γ , TNF- α e Fas-ligando ⁴⁵) è riscontrata nel 75% dei M-PTLD. L'ipermetilazione di *TP73* si verifica nel 20% dei PTLT; TP73 è un gene oncosoppressore, il cui prodotto proteico, analogamente a p53, induce l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi.

Ipermutazioni somatiche aberranti: sono state riscontrate in almeno il 30% dei casi di PTLT (soprattutto nei linfomi B diffusi a grandi cellule). Comportano la deregolazione di promotori o sostituzioni aminoacidiche di geni, alterando le caratteristiche biochimico-strutturali dei loro prodotti proteici⁴⁶.

1.4 Presentazione clinica

Le caratteristiche cliniche dei PTLT variano in relazione al tipo di trapianto, al regime immunosoppressivo e all'istotipo anatomico-patologico. I pazienti sottoposti a TOS sono trattati con CsA o tacrolimus; in tale contesto i PTLT insorgono entro il primo anno dal trapianto e più precocemente rispetto all'era pre-CsA^{3,47}. I PTLT EBV-negativi e quelli di linea T/NK compaiono più tardivamente, mediamente a 5 anni e 6.5 anni rispettivamente^{48,49,50}. I PTLT che si sviluppano dopo un TMO si presentano mediamente a distanza di circa 6 mesi²⁰. All'esordio i sintomi possono essere aspecifici, comprendendo malessere, sonnolenza, calo ponderale e febbre (50%)⁵¹. Sono presentazioni comuni le linfadenopatie (30%) e le disfunzioni organo-specifiche; nelle lesioni precoci pazienti possono accusare sintomi simili a quelli della mononucleosi

infettiva e non è inusuale il coinvolgimento del tessuto tonsillare e dell'anello di Waldeyer, specie nei bambini. Rara l'eventualità di un esordio "fulminante" simile allo shock settico. Nei due terzi dei casi^{21,52} la patologia coinvolge un singolo distretto anatomico, di cui il 25% è rappresentato dalla localizzazione nodale ed il 75% da una sede extranodale (reni, tratto gastroenterico, fegato, mediastino, cute o sistema nervoso centrale); nel terzo restante le lesioni sono multiple e coinvolgono particolarmente i linfonodi e il fegato. I PTLD che insorgono dopo un trapianto di rene o di cuore riguardano più frequentemente linfonodi, fegato, polmoni ed intestino, mentre il coinvolgimento dell'organo trapiantato è inusuale^{21,51}. Al contrario, i PTLD che seguono un trapianto di polmone sono spesso ad insorgenza nello stesso. Dopo un TMO, i sintomi possono simulare una GVHD¹². Il sistema nervoso centrale è coinvolto nel 30% dei pazienti^{23,52,53} e in molti casi la malattia è confinata in tale sede; nell'immunocompetente, solo l'1% dei linfomi non Hodgkin vede un interessamento isolato del sistema nervoso centrale. Nel 25% dei casi si verifica insufficienza d'organo a carico del trapianto, per coinvolgimento neoplastico⁵⁴. Istotipi diversi possono essere riscontrati nello stesso paziente, sia simultaneamente che sequenzialmente; inoltre, biopsie successive della medesima lesione possono mostrare un quadro istologico di regressione o progressione⁵⁵.

1.5 Classificazione istopatologica

Negli ultimi vent'anni molte sono state le proposte classificative per questo tipo di disordine^{3,6,55,56}. La più recente classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità¹ distingue: 1) lesioni precoci, 2) PTLD polimorfi, 3) PTLD monomorfi e 4) PTLD tipo linfoma di Hodgkin classico, escludendo da tale categoria le forme Hodgkin-simili, che più spesso mostrano un fenotipo aberrante con espressione di antigeni di linea B.

1.5.1 Lesioni precoci: iperplasia plasmacitica e PTLD simil-mononucleosi infettiva

Definizione: sono proliferazioni linfoide e plasmacellulare che sostanzialmente preservano l'architettura del tessuto coinvolto, più spesso tonsille e linfonodi nei quali risultano riconoscibili cripte, sinusoidi e, in alcuni casi, follicoli reattivi residui.

Caratteristiche cliniche: si manifestano in pazienti pediatrici o negli adulti dopo un TOS, in assenza di una pregressa infezione da EBV. Insorgono per la maggior parte

entro il primo anno dal trapianto coinvolgendo linfonodi, tonsille palatine e adenoidi. La riduzione dell'immunosoppressione ne favorisce la regressione e la cura, tuttavia alcune forme simil-mononucleosiche possono essere fatali ed altre evolvere a lesioni polimorfe o monomorfe.

Aspetti morfologici: l'iperplasia plasmacitica si caratterizza per aggregati di plasmacellule mature e più rari immunoblasti ad esse commisti, mentre le forme simil-mononucleosiche mimano la mononucleosi infettiva, con un'espansione della zona paracorticale da parte di immunoblasti, piccoli linfociti T e plasmacellule. I criteri per distinguere le forme precoci di PTLD da infiltrati linfoidi reattivi non sono ben definiti e si basano primariamente su: estensione della proliferazione, correlazione clinica, presenza o assenza di EBV.

Profilo immunofenotipico: tali proliferazioni hanno carattere policlonale e politipico; all'indagine immunoistochimica le cellule immunoblastiche e le plasmacellule esprimono marcatori di natura B-cellulare (CD20 e CD79a rispettivamente) ed integrano tipicamente l'EBV (EBV-LMP1⁺).

Profilo molecolare e citogenetico: nell'iperplasia plasmacitica non sono presenti riarrangiamenti monoclonali dei geni codificanti per le catene pesanti delle immunoglobuline, anche se piccoli cloni possono essere occasionalmente dimostrati con Southern-blot, usando sonde per la "terminal repeat region" del genoma virale⁵⁷. Alcuni casi di PTLD simil-mononucleosici presentano esigue popolazioni monoclonali od oligoclonali il cui significato è ancora da chiarire.

1.5.2 PTLD polimorfi (P-PTLD)

Definizione: i PTLD polimorfi sono lesioni citologicamente miste, costituite da immunoblasti, plasmacellule e cellule linfoidi di taglia variabile da piccola a media, che, a differenza delle lesioni precoci, sovvertono l'architettura del linfonodo interessato o formano masse extra-nodali a carattere distruttivo, senza tuttavia completamente soddisfare i criteri diagnostici per un linfoma.

Caratteristiche cliniche: la prevalenza di P-PTLD varia dal 20% all'80% secondo le casistiche considerate^{3,4,5,6,49}. Nei pazienti pediatrici è il disordine più frequente, spesso quale conseguenza di un'infezione primaria da EBV. Insorgono in qualsiasi momento dopo il trapianto con una presentazione clinica non dissimile da quella dei restanti PTLD. La riduzione dell'immunosoppressione comporta la regressione della malattia in

una percentuale variabile di casi; alcuni pazienti possono incorrere in una progressione della lesione e necessitare dell'uso di trattamenti più aggressivi.

Aspetti morfologici: da un punto di vista istologico, la differenza più rilevante nei confronti delle lesioni precoci è il sovvertimento architetturale dei tessuti coinvolti; rispetto ai linfomi propriamente detti invece, i P-PTLD si distinguono per la presenza di cellule B in tutte le fasi di maturazione (linfociti di piccola e media taglia e cellule centrocito-simili, immunoblasti e plasmacellule). Possono essere presenti anche immunoblasti "atipici" (cellule di forma bizzarra che spesso ricordano le cellule di Reed-Sternberg), aree di necrosi a carta geografica e numerose mitosi. In alcuni casi si rilevano aree più monomorfe: tali aspetti potrebbero suggerire una soluzione di continuo tra P-PTLD e M-PTLD.

Profilo immunofenotipico: immunoistochimicamente i P-PTLD mostrano una commistione di linfociti B e T (talora preponderanti); le immunoglobuline (Ig) citoplasmatiche e di membrana possono essere politipiche o monotipiche. Se è presente una restrizione per le catene leggere delle Ig, questa è focale e in alcuni pazienti possono essere dimostrate popolazioni clonali nella stessa sede o in sedi differenti. Le cellule simil-Reed-Sternberg, quando presenti, sono frequentemente positive per CD30 e CD20 ma negative per CD15. Nella maggioranza dei casi è dimostrabile EBV sia con immunoistochimica (LMP1, EBNA2) che con ibridazione in situ (EBER).

Profilo molecolare e citogenetico: i P-PTLD mostrano un riarrangiamento monoclonale dei geni delle immunoglobuline, sebbene tale fenomeno sia meno spiccato rispetto ai M-PTLD^{6,58}. Nei casi EBV positivi il metodo più valido per dimostrare la monoclonalità della popolazione linfocitaria è l'analisi delle sequenze della "terminal repeat region" del genoma virale. Il 75% dei P-PTLD ha mutazioni dei geni delle IgV senza mutazioni "ongoing" mentre il restante 25% è non mutato. Citogeneticamente, possono inoltre essere riscontrate ipermutazioni somatiche di BCL6, così come un'ipermetilazione aberrante del suo promoter, ma non sono coinvolti altri oncogeni (MYC, RAS and TP53)^{33,59}.

1.5..3 PTLD monomorfi (M-PTLD)

I M-PTLD sono veri e propri linfomi, di natura B o T-linfocitaria, biologicamente aggressivi, con caratteristiche sovrapponibili alle controparti che insorgono nel paziente immunocompetente. Sebbene il termine "monomorfo" si riferisca alla monotonia degli

elementi neoplastici, è possibile un significativo pleomorfismo e una certa variabilità dimensionale delle cellule linfomatose. Inoltre, poiché i P-PTLD e i M-PTLD non hanno una chiara linea di demarcazione, ma piuttosto un certo grado di sovrapposizione (c.d. “zona grigia”), l’attribuzione di un caso all’uno o all’altro gruppo può risultare difficoltosa: ad oggi i criteri diagnostici sono di tipo istologico (numero di cellule di grande taglia) e molecolare (anomalie cromosomiche di oncogeni o geni oncosoppressori).

M-PTLD a cellule B - caratteri generali

Definizione: i M-PTLD a cellule B sono proliferazioni monoclonali linfoidi o plasmacellulari che soddisfano i criteri diagnostici per un linfoma a grandi cellule B di tipo diffuso, un linfoma di Burkitt o una neoplasia plasmacellulare (mieloma multiplo o plasmacitoma extramidollare).

Caratteristiche cliniche: la presentazione clinica è quella tipica delle neoplasie linfoidi con sintomi B (febbre, astenia, calo ponderale, sudorazioni notturne), linfo-adenopatie, organomegalia, incremento della lattico-deidrogenasi sierica (LDH). I PTLD di tipo plasmacellulare riproducono lesioni ossee ed extra-ossee simili alle loro controparti nell’immunocompetente e sono accompagnati da una componente monoclonale sierica ed urinaria o da ipergammaglobulinemia.

Aspetti morfologici: la morfologia è sovrapponibile alle controparti del soggetto immunocompetente. Nei linfomi B a grandi cellule di tipo diffuso, possono comparire cellule bizzarre, giganti o binucleate simil-Reed-Sternberg così come può essere presente una differenziazione plasmoblastica.

Profilo immunofenotipico: le lesioni linfoidi esprimono CD20 e CD79a con restrizione monotipica per le catene leggere delle immunoglobuline nel 50% dei casi. La molecola di attivazione CD30 è espressa in molti casi, anaplastici e non¹. La maggior parte ha un fenotipo di tipo attivato (ABC) ed integra l’EBV. I casi EBV negativi hanno più frequentemente un fenotipo di tipo centro germinativo (GCB)⁶⁰.

Profilo molecolare e citogenetico: i M-PTLD mostrano riarrangiamento monoclonale delle IgVh, e un’alta percentuale le cellule trasformate contiene il DNA virale in forma episomica⁴. Molti casi presentano mutazioni ipersomatiche stabili e solo una piccola parte di lesioni mostra ipermutazioni “ongoing”. Per quel che concerne le alterazioni a carico degli oncogeni, possono riscontrarsi mutazioni di RAS o di TP53 e

riarrangiamenti di MYC; è frequente l'ipermutazione somatica di BCL6, mentre sono rare sue traslocazioni^{6,59}. Le anomalie citogenetiche sono più frequenti rispetto alle lesioni precoci e ai P-PTLD; alcune ricorrenti sono delezioni a carico delle regioni 1q11-q21, 8q24.1, 3q27, 16p13, 14q32, 11q23-24 e trisomie 7,9, 11, 12, X. Le lesioni EBV-negative sovente perdono l'espressione dell'inibitore della chinasi ciclina-dipendente CDKN2A (p16/INK4a). Infine possono trovarsi ipermetilazioni anomale a carico di regioni promotrici e ipermutazioni somatiche a livello di geni diversi da quelli codificanti per le immunoglobuline.

a) Linfoma B diffuso a grandi cellule

Il linfoma B diffuso a grandi cellule (DLBCL, sec. WHO) è una proliferazione neoplastica composta da grandi cellule di derivazione B-linfocitaria. Le dimensioni del nucleo neoplastico risultano maggiori/uguali al diametro nucleare di un macrofago oppure, rapportate ad un linfocita normale, superano di due volte la sua taglia. Questo linfoma tende a sovvertire l'architettura del tessuto sottostante - nodale o extranodale - con una modalità di crescita tipicamente diffusa. Il coinvolgimento linfonodale può essere completo, parziale, interfollicolare o, meno comunemente, intrasinusoidale; il tessuto adiposo perinodale è spesso infiltrato dalla malattia. Possono concomitare bande di sclerosi, focolai di necrosi coagulativa o detriti apoptotici. Tra le varianti morfologiche si annoverano:

Variante centroblastica: è il sottogruppo più rappresentato, costituito da cellule di grande taglia con nucleo rotondeggiante vescicoloso, cromatina finemente dispersa e multipli nucleoli, disposti al di sotto della membrana nucleare. Il citoplasma è scarso con colorazione da amfofila a basofila. La popolazione cellulare può essere puramente centroblastica oppure può contenere, in percentuale variabile, cellule multilobate ed immunoblasti⁶¹.

Variante immunoblastica: è la variante in cui più del 90% della popolazione cellulare è costituita da immunoblasti, ossia cellule con un singolo nucleolo centrale e citoplasma basofilo. La diagnosi differenziale con un linfoma plasmoblastico o con un mieloma plasmacellulare di alto grado si basa sulla clinica e sul profilo immunofenotipico.

Variante anaplastica: trattasi di un sottotipo di DLBCL caratterizzato da cellule ampie e pleomorfe, provviste di nuclei bizzarri ed irregolari, talora simili a cellule di Hodgkin e/ o di Reed-Sternberg. La crescita può essere coesiva o intrasinusoidale, mimando in

quest'ultima eventualità la diffusione di un carcinoma⁶². Da un punto di vista immunofenotipico, il DLBCL esprime i marcatori di linea B (CD19, CD20, CD22, CD79a) e nel 50-75% dei casi è dimostrabile l'espressione di immunoglobuline di superficie e/o intra-citoplasmatiche (in ordine di frequenza IgM>IgG>IgA)¹. Nei soggetti immunocompetenti la variante anaplastica è caratteristicamente CD30-positiva, mentre i restanti sottotipi solo occasionalmente lo sono⁶³. Nel contesto di un PTLD l'espressione del CD30 è un aspetto frequente. La frazione di crescita valutata mediante Ki-67/MIB1 è solitamente superiore al 40%, e in certi pazienti può addirittura superare il 90%⁶⁴. Come per i DLBCL del paziente immunocompetente, anche nell'ambito dei PTLD è possibile applicare la distinzione in sottocategorie prognostiche in relazione al profilo di espressione genica e all'espressione immunoistochimica di precisi marcatori. Secondo lo studio pilota di Alizadeh⁶⁵, i LBDGC possono essere distinti in tre categorie:

1. *GCB-DLBCL*: linfomi con il fenotipo a tipo centro germinativo, corrispondente alla combinazione antigenica CD10⁺/Bcl6⁺/IRF4^{+/-}/Bcl2⁻
2. *ABC-DLBCL*: linfomi con un profilo di espressione genica simile a quello delle cellule periferiche B attivate in vitro ed il seguente immunofenotipo: CD10⁻/Bcl6⁻/IRF4⁺/CD138⁺ oppure Bcl2⁺/CD30⁺.
3. *DLBCL non classificabili (NC)*: raccoglie i casi con espressione genica intermedia alle prime due classi e costante espressione di Bcl2.

I casi con profilo "GCB" hanno una prognosi significativamente migliore rispetto ai casi con profilo attivato⁶⁵. Non esiste una correlazione tra profilo genico e morfologico: la variante immunoblastica e la centroblastica con un alto contenuto di immunoblasti sono più spesso riconducibili ad un profilo "ABC", pur potendo in altri casi esibire un fenotipo "GCB".

b) Linfoma di Burkitt

Il linfoma di Burkitt (LB) è una neoplasia linfoide provvista di caratteristiche morfologiche assolutamente peculiari. La presentazione clinica è nodale e soprattutto extranodale (intestino, cavità addominale, retroperitoneo), dove la neoplasia forma masse in rapida crescita. In forma di PTLD è raro⁶⁶, ma come nel paziente immunocompetente si tratta di una proliferazione di medie cellule omogenee e coese, provviste di citoplasma intensamente basofilo, finemente vacuolato, nucleo

rotondeggiante con cromatina reticolare e multipli nucleoli evidenti. La neoplasia presenta numerose figure mitotiche ed aspetti di necrosi apoptotica; inoltre concomitano numerosi macrofagi che, fagocitando i detriti necrotici, conferiscono al quadro un tipico aspetto “a cielo stellato”. Da un punto di vista immunohistochimico è altrettanto peculiare l’espressione di marcatori B (CD20, CD79a) e del centro germinativo (CD10, Bcl6), la negatività di Bcl2 e una frazione di crescita (Ki-67/MIB1) pari al 100% degli elementi neoplastici. In genere, questa tipologia di PTLD non risponde alla diminuzione della terapia immunosoppressiva e richiede trattamenti più aggressivi combinando chemio e radioterapia.

c) Mieloma multiplo/plasmacitoma extramidollare

Solo raramente i pazienti trapiantati sviluppano un mieloma multiplo (MM). Le lesioni possono essere EBV-positive o negative; questa forma di M-PTLD risponde poco alla riduzione dell’immunosoppressione. Come la sua controparte nell’immunocompetente, il MM è una neoplasia plasmacellulare, contraddistinta dalla presenza di una componente monoclonale sierica o urinaria e da lesioni osteolitiche. Da un punto di vista istopatologico, la neoplasia si manifesta con un infiltrato plasmacellulare intramidollare disposto in aggregati e in noduli o diffuso. Citologicamente si distinguono forme di basso grado (plasmacellule mature con nucleo eccentrico, cromatina a “ruota di carro”, abbondante citoplasma basofilo), di grado intermedio (plasmacellule polimorfe, clivate o nucleolate/asincrone) e di alto grado (infiltrato con alto rapporto nucleo/citoplasmatico, nucleolo prominente e cromatina finemente dispersa). Immunofenotipicamente, le cellule risultano monotipiche per le catene leggere delle Ig, esprimono marcatori di linea (CD38, CD79a e CD138). Usualmente negativo il CD20. Altrettanto rari sono i PTLD con sembianze affini a quelle di un plasmacitoma extramidollare; le sedi interessate comprendono linfonodi e sedi extranodali (tratto gastrointestinale).

M-PTLD a cellule T/NK - caratteri generali

Definizione: sotto la definizione di PTLD a cellule T/NK sono raggruppate le lesioni che soddisfano i criteri diagnostici per un linfoma a cellule T o natural killer (NK). Essi costituiscono circa il 15% di tutti i PTLD⁶⁷. Gli istotipi di più frequente riscontro nel paziente trapiantato sono il linfoma a cellule T periferiche, NAS e il linfoma T epato-

splenico⁵⁰. Più raramente sono stati riportati casi di leucemia a linfociti T ampi e granulati⁶⁸, leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto⁶⁹, linfoma extranodale a cellule T/NK di tipo nasale⁷⁰, micosi fungoide/sindrome di Sézary, linfoma a grandi cellule anaplastiche, primitivo della cute e linfoma a grandi cellule anaplastiche⁷¹.

Caratteristiche cliniche: la presentazione dipende dal tipo di linfoma T/NK. Sono spesso ad esordio extranodale, interessando midollo osseo, circolo ematico, milza, cute, fegato, tratto gastroenterico e polmoni, con o senza linfadenopatie associate.

Aspetti morfologici: le caratteristiche istologiche sono le stesse dei linfomi T/NK che colpiscono i soggetti immunocompetenti¹.

Profilo immunofenotipico: i PTLD a cellule T/NK esprimono gli antigeni di linea T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8), di linea NK (CD56, CD57) o citotossici (Tia-1, Granzyme B e perforina). I linfomi a grandi cellule anaplastiche primitivi della cute sono CD30 positivi, mentre nelle forme sistemiche può concomitare l'espressione della proteina ALK. A differenza dei M-PTLD di tipo B, solo un terzo dei T è positivo per l'EBV⁴⁸.

Profilo molecolare e citogenetico : alcuni casi mostrano riarrangiamento monoclonale del gene codificante per il T di tipo γ . Le anomalie cromosomiche sono le stesse riscontrate nei linfomi T dell'immunocompetente (isocromosoma 7 e trisomia del cromosoma 8 nei casi di linfoma epato-splenico). Sono diffuse anche le mutazioni di TP53 e di altri oncogeni.

1.5.4 PTLD tipo linfoma di Hodgkin classico

A questa categoria corrispondono lesioni che soddisfano i criteri diagnostici per un linfoma di Hodgkin di tipo classico (LHC). Sono nella quasi totalità linfomi EBV-positivi e insorgono con maggior frequenza dopo un trapianto di rene. Poiché cellule simil-Reed-Stenberg possono essere presenti nelle lesioni precoci, nei P-PTLD e in alcuni M-PTLD, la diagnosi deve essere basata su criteri morfologici e immunofenotipici. Il quadro morfologico è caratterizzato dalla presenza di cellule diagnostiche dette di Hodgkin quando mononucleate e di Reed-Sternberg quando bi- o multinucleate; si tratta di cellule ampie, con abbondante citoplasma leggermente basofilo e nucleoli acidofili prominenti. Esse sono inserite in un contesto non neoplastico, citologicamente polimorfo, costituito da una variabile proporzione di piccoli linfociti, granulociti eosinofili e neutrofili, istiociti, plasmacellule mature e

fibroblasti. I criteri immunofenotipici includono la positività per CD30, CD15 e PAX-5 e la negatività per CD45/LCA^{72,73}, che consentono la distinzione dalle forme simil-Hodgkin (CD45⁺, CD30⁺, CD20⁺).

1.6 Diagnosi di PTLD

La diagnosi di PTLD si basa sull'esame istologico effettuato su un campione bioptico rappresentativo della lesione⁸. La biopsia escissionale è da preferirsi all'agobiopsia, che dovrebbe essere riservata solo ai casi in cui non è praticabile l'escissione completa del tessuto patologico. Aspetti morfologici e risultati immunoistochimici valgono per una precisa classificazione isto-patologica⁷⁴. La ricerca dell'EBV può essere condotta con tecniche di immunoistochimica (LMP1, EBNA2) o mediante ibridazione in situ (EBER)⁷⁴. I casi immunoistochimicamente dubbi o non conclusivi possono essere sottoposti infine ad indagini di biologia molecolare per valutarne la monoclonalità. Come del caso dei linfomi dell'immunocompetente, la stadiazione di malattia prevede una biopsia osteomidollare, una tomografia computerizzata (TC) toraco-addominale una risonanza magnetica nucleare (RMN) cerebrale e indagini radiologiche specifiche per lo studio del tratto gastro-enterico.

1.7 Profilassi

Dato il ruolo eziopatogenetico svolto dall'EBV, la profilassi comprende, la riduzione dell'immunosoppressione, la vaccinazione, l'uso di farmaci antivirali e lo sviluppo in vitro di linfociti T citotossici specifici per il virus. Nei riceventi sieronegativi è sconsigliato un trapianto d'organo da donatore EBV-positivo, ma spesso ciò non è evitabile data la scarsa disponibilità di donatori.

1.7.1 Vaccinazione per EBV

Una delle strategie adottate per ridurre il rischio di PTLD, è la vaccinazione profilattica pre-trapianto, specie nei pazienti pediatrici, allo scopo di ottenere la sieroconversione. I primi studi condotti al riguardo mostrano una buona risposta immunitaria in volontari sani⁷⁵. Tuttavia, la risposta anticorpale è meno efficace nei bambini che soffrono da tempo di una patologia cronica, poiché la malattia di base può indebolire l'efficienza del sistema immunitario.

1.7.2 Farmaci anti-virali

I farmaci anti-virali potrebbero avere un ruolo nella prevenzione dei PTLD, ma non è ancora stato dimostrato un chiaro beneficio. Gli inibitori della timidina-chinasi, quali aciclovir e ganciclovir, potrebbero essere utili nel limitare la replicazione in fase litica, ottenendo una riduzione della carica virale e prevenendo l'infezione di nuove cellule; non hanno invece effetto sulle cellule B con infezione latente o sulle cellule trasformate. Le immunoglobuline per e.v. e il Foscarnet (bloccante della DNA-polimerasi virale) neutralizzano l'infettività del virus; potrebbero avere un ruolo protettivo sia nei confronti dell'infezione da EBV che nel prevenire l'insorgenza di PTLD in pazienti ad alto rischio^{76,77}.

1.7.3 "Pre-emptive" therapy

E' una terapia preventiva basata sulla determinazione della carica virale o dei livelli sierici di citochine. Nei pazienti trapiantati ad elevato rischio di sviluppare un PTLD la carica virale (espressa come copie di genoma virale / μg DNA nelle cellule mononucleate del sangue periferico) è valutata periodicamente: diversi studi hanno infatti evidenziato come lo sviluppo del PTLD sia frequentemente accompagnato da un significativo incremento del suddetto parametro⁷⁸⁻⁸⁰. La sensibilità di questo test varia dal 39 all'87% secondo le casistiche, mentre la specificità si approssima al 100%^{81,82}. La sensibilità raggiunge i più alti valori nella popolazione pediatrica, soprattutto se la sierconversione avviene dopo il trapianto. Una carica virale elevata o in rapido aumento è un parametro utile per modulare l'intensità del regime immunosoppressivo o per avviare una terapia con linfociti T-citotossici specifici. Il valore di soglia per intraprendere la terapia corrisponde ad una carica virale superiore a 500 copie / 10^5 linfociti, per quanto tale "cut-off" resti ancora materia di dibattito. Un ulteriore esame utile alla valutazione di soggetti ad alto rischio è la misurazione della concentrazione sierica di IL-6 e IL-10^{83,84}.

1.8 Terapia

La strategia terapeutica varia in relazione al tipo di PTLD. Le lesioni precoci sono processi benigni, per i quali la riduzione dell'immunosoppressione è curativa. La prognosi è eccellente, specie nei bambini. I P-PTLD e meno spesso i M-PTLD possono rispondere alla riduzione dell'immunosoppressione, ma questo approccio può favorire

un rigetto acuto o cronico con perdita dell'organo trapiantato o, nei casi più gravi, decesso del paziente. Una parte dei P-PTLD e un numero più cospicuo di M-PTLD richiedono terapie aggiuntive quali immunoterapia con anticorpi monoclonali (Rituximab), chemioterapia o una combinazione di entrambi. Le lesioni mielomatose usualmente non regrediscono con riduzione dell'immunosoppressione e i PTLD a cellule T/NK (con la sola eccezione della leucemia a linfociti ampi e granulati) sono considerati linfomi aggressivi e come tali trattati.

1.8.1 Riduzione dell'immunosoppressione

Il trattamento iniziale di tutte le forme di PTLD è una diminuzione del regime immunosoppressivo, volta al potenziamento del sistema immunitario del ricevente. Nei casi EBV-positivi ciò consente di restaurare, in parte, l'efficacia dei linfociti T-citotossici EBV-specifici. Questo approccio terapeutico deve essere strettamente personalizzato, valutando tipo di trapianto, tipo di malattia e sua estensione. I dosaggi della CsA o del tacrolimus possono essere ridotti fino al 25-50% del normale livello terapeutico. Farmaci quali l'azatioprina e il micofenolato dovrebbero essere ridotti o sospesi. La dose dei corticosteroidi dovrebbe essere mantenuta a 7.5-10 mg/die, per consolidare la funzionalità dei linfociti T-citotossici e al contempo prevenire il rigetto. La risposta si rende evidente in 2-4 settimane⁸⁵; la riduzione del numero e delle dimensioni delle lesioni può essere monitorata con esami radiologici. Inoltre, se la lesione è EBV-correlata, la regressione del tumore può essere stimata dimostrando la diminuzione del numero di copie virali nel sangue periferico⁸⁶, sebbene alcuni studi sostengano che non esista una sicura correlazione tra la diminuzione della carica virale e la risposta clinica al trattamento^{87,88}. La sola diminuzione dell'immunosoppressione consente una remissione a lungo termine nel 40-86% dei pazienti pediatrici^{89,90} e nel 25-60% degli adulti⁹¹. Tale variabilità è dettata dal tipo di PTLD: le lesioni precoci mostrano una buona risposta ed ottima prognosi, mentre i casi monoclonali - specialmente se presentano mutazione a carico di BCL6 - tendono ad essere scarsamente responsivi^{47,59}.

1.8.2 Chemioterapia

I chemioterapici vengono introdotti quando la riduzione del regime immunosoppressivo non è da sola sufficiente per ottenere la remissione di malattia. Ciò si applica particolarmente ai casi di M-PTLD, caratterizzati da una maggiore aggressività biologica. I protocolli più utilizzati sono CHOP (Ciclofosfamide, Adriamicina, Vincristina e Prednisone) e VAPEC-B (Adriamicina, Etoposide, Ciclofosfamide, Metotrexate, Bleomicina e Vincristina)⁹²⁻⁹⁴, associati a fattori di crescita emopoietici, per ridurre il rischio di infezioni e sepsi da neutropenia. L'uso dei chemioterapici, tuttavia, è gravato da un'alta mortalità causata dalla tossicità del trattamento.

1.8.3 Anticorpi monoclonali

Il razionale dell'uso di anticorpi monoclonali è insito nel fatto che la maggior parte dei PTLD sono proliferazioni linfoidi a cellule B. Il Rituximab, un anticorpo monoclonale diretto verso l'antigene CD20, trova largo impiego in numerosi LNH B del paziente immunocompetente⁹⁵⁻⁹⁷. Milpied⁹⁸ e Faye⁹⁹ hanno riportato risultati promettenti nei PTLD ad esordio precoce mentre quelli ad esordio tardivo sembrano essere meno responsivi¹⁰⁰. Infine i PTLD che interessano il sistema nervoso centrale non sono sensibili al Rituximab, poiché il farmaco non penetra la barriera emato-encefalica¹⁰¹. In conclusione, il Rituximab in associazione alla terapia convenzionale sembra mostrare risultati promettenti, ma sono necessari studi con periodi di osservazione più prolungati per consentirne una piena validazione.

1.8.4 Farmaci modulanti i livelli citochinici

Sono state sperimentate, nel ruolo di adiuvanti, alcune molecole capaci di interferire con l'assetto citochinico del tumore - in particolare IFN- α e l'anticorpo monoclonale anti-IL6 - ma ancora non sussistono dati sufficienti che supportino la loro applicazione nella pratica clinica. IFN- α amplifica l'azione citotossica dei linfociti T; alcuni studi documentano l'associazione di IFN- α e chemioterapia nel trattamento dei LNH-B nei pazienti immunocompetenti e il suo utilizzo nella terapia mantenimento di pazienti in remissione¹⁰²⁻¹⁰⁴. Hagenbeek¹⁰⁴ conclude che IFN- α rallenta la progressione della malattia, ma non migliora la sopravvivenza. Altri studi stressano la necessità di farne un uso cauto sia a causa della sua tossicità, che per la sua capacità di promuovere l'attività dei linfociti T CD8+, che potrebbe favorire un rigetto acuto nell'organo trapiantato^{66,105}.

IL-6 può favorire lo sviluppo dei PTLD in virtù della sua capacità di promuovere la proliferazione delle cellule B infette e di favorire la crescita tumorale delle cellule immortalizzate¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. L' anticorpo monoclonale anti-IL-6 è stato utilizzato in uno studio condotto su 12 pazienti con PTLD refrattari alla riduzione dell'immunosoppressione¹⁰⁹, apparendo promettente come terapia supplementare. Sono tuttavia necessari ulteriori studi per ottenere maggiori garanzie al riguardo.

1.8.5 Rapamicina, Sirolimus ed Everolimus

La Rapamicina è un potente farmaco immunosoppressore. È stata impiegata, con buoni risultati, come farmaco di prima scelta nei pazienti con trapianto solido e come terapia di “salvataggio” nei casi complicati da rigetto acuto. Il suo meccanismo d'azione è basato sull'interazione con FKBP12 (*FK506 binding protein 12*), assieme alla quale inibisce mTOR, una serina/treonina-proteinchinasi coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare. La Rapamicina è in grado di bloccare in fase G1 diversi tipi cellulari, compresi i linfociti B e T non neoplastici; è inoltre capace di inibire la crescita di cellule B maligne, come nel caso della leucemia linfatica cronica B/linfoma a piccoli linfociti B. Questa molecola svolge anche un'azione anti-angiogenetica e anti-tumorale, caratteristiche che la rendono potenzialmente ideale nei pazienti con PTLD in remissione e con rigetto cronico¹¹⁰.

Everolimus e Sirolimus sono due nuovi immunosoppressori che, con un meccanismo d'azione simile a quello della Rapamicina, inibiscono TOR producendo un effetto immunosoppressivo e anti-proliferante. Si sono rivelati promettenti sia nella prevenzione che nella terapia dei PTLD: uno studio evidenzia come la somministrazione coniugata di Sirolimus e CsA nei pazienti con trapianto di rene sia associata ad una bassa incidenza di PTLD¹¹¹.

1.8.6 Linfociti T citotossici EBV-specifici (CTL)

Pazienti con trapianto di midollo osseo: questa strategia è stata applicata con buoni risultati, sia nella profilassi che nel trattamento dei PTLD in pazienti con trapianto di midollo osseo, dove il disordine linfo-proliferativo ha più spesso origine dal donatore. Per stimolare ed espandere il numero di CTL EBV-specifici, si utilizzano linee cellulari linfoblastoidi (LCL) immortalizzate dall'EBV messe in coltura con cellule mononucleate del sangue periferico del donatore, in presenza di IL-2. I linfociti T così

ottenuti hanno dimostrato in vitro di essere in grado di uccidere le LCL del donatore; quando infusi nel paziente non compromettono il trapianto e, cosa più importante, eradicano il tumore¹⁰⁵.

Pazienti con trapianto di organo solido: i PTLD originano dal sistema immunitario del ricevente. In tale circostanza colture policlonali derivate dal paziente sono espanse in vitro e attivate usando LCL autologhe. Una volta inoculati nel paziente, favoriscono la regressione della lesione, senza significative complicanze correlate a fenomeni di auto-reattività o di rigetto. Tuttavia, nonostante la remissione clinica e l'apparente risoluzione del PTLD, la malattia può riemergere¹¹².

Nei pazienti sieronegativi per l'EBV la creazione di linfociti T-citotossici autologhi è ostacolata dalla mancanza di cellule T di memoria in grado di riconoscere il virus. Un approccio alternativo sfrutta l'azione di linfociti T provenienti da un donatore sano EBV+, il cui profilo HLA abbia un'alta affinità con quello del paziente. I risultati raggiunti con questo metodo indicano una remissione nel circa 60% dei pazienti trattati, con minima incidenza di tossicità o di sensibilizzazione verso i linfociti T-citotossici allogenici¹¹³.

1.8.7 Terapia dei PTLD del sistema nervoso centrale

I PTLD che interessano il SNC hanno una pessima prognosi. Uno studio condotto su 289 pazienti riporta una mortalità complessiva dell'88%¹¹⁴. Il trattamento più efficace è la radioterapia locale. Il Rituximab e altri agenti chemioterapici non oltrepassano la barriera emato-encefalica e, sebbene sia possibile tentare una loro somministrazione per via intra-tecale, sono ancora troppo esigui i dati in letteratura per poter raccomandarne l'uso. Il Metotrexate, in infusione intra-tecale, è il farmaco di scelta nei linfomi del sistema nervoso centrale del paziente immunocompetente, ma non nei pazienti trapiantati data la sua tossicità epatica e renale.

2. Scopo dello studio

Scopo dello studio è stata l'analisi immunoistochimica e molecolare di un'ampia casistica di linfomi post-trapianto insorti in un contesto di immunosoppressione, con particolare riferimento al linfoma B diffuso a grandi cellule e al linfoma di Burkitt. Lo studio immunoistochimico ha preso in considerazione l'espressione di alcuni marcatori (PKC- β , FOXP-1, Ciclina D2, Ciclina D3, Survivina), rivelatisi fattori prognostici sfavorevoli nell'andamento dei linfomi B diffusi a grandi cellule del paziente immunocompetente e, allo stato dell'arte, non ancora studiati nel linfoma aggressivo dell'immunodepresso. Lo studio con FISH ha considerato lo stato mutazionale di BCL2 e MYC.

3. Materiali e metodi

3.1 Casistica

Cinquantadue campioni biotici fissati in formalina e inclusi in paraffina, relativi a 50 pazienti, sono stati raccolti dagli archivi di tre centri di Anatomia Patologica: 27 casi di provenienza dall'Ospedale Niguarda – Cà Granda di Milano, 13 dal Policlinico San Matteo di Pavia e 10 dall'Unità Operativa di Emolinfopatia del Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna. In due pazienti il linfoma mostrava multiple localizzazioni: linfonodale e splenica in un caso e linfonodale e cutanea nell'altro. In tutti i casi risultavano disponibili le seguenti informazioni: sesso, età, tipo di organo trapiantato, intervallo tra il trapianto e l'esordio della malattia, sede della lesione e diagnosi istologica. L'andamento di malattia è stato disponibile in 49 pazienti su 50.

3.2 Istologia e allestimento del tissue micro-array (TMA)

Dai blocchetti in paraffina sono state tagliate sezioni dello spessore di 4µm, quindi colorate con ematossilina-eosina e giemsa. Al microscopio ottico, per ciascun caso, è stata contrassegnata un'area rappresentativa della lesione e quindi identificata sul blocchetto corrispondente. Utilizzando uno strumento dedicato (micro-arrayer, *Beecher Instruments, Inc*) si è proceduto a costruzione del TMA: dai blocchetti sono stati eseguiti 2 carotaggi del diametro di 1 mm; in seguito i cilindri biotici sono stati inclusi in un unico blocchetto accettore. Dal blocchetto così ottenuto sono state ricavate nuove sezioni dello spessore di 4 µm, successivamente colorate con ematossilina-eosina e giemsa (Fig.1a).

3.3 Immunoistochimica

Dal TMA così ottenuto sono state tagliate sezioni dello spessore di 4 µm, montate su vetrini carichi elettricamente e re-idratate; per favorire lo smascheramento antigenico le sezioni sono state immerse in acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 1mM (pH 8.0) o citrato e quindi esposte ad una fonte di calore (due cicli di 5 minuti in forno a microonde, ad una potenza di 750 o 900 W). Una volta raffreddate, le sezioni sono state inserite in un immunocoloratore (*TechMate 500 immunostainer*) e incubate, per 30 minuti, a temperatura ambiente, con anticorpi monoclonali (Tabella 1). Il legame antigene-anticorpo è stato dimostrato con metodica APAAP (immunocomplessi

fosfatasi alcalina / anti-fosfatasi alcalina) o Envision⁺ (Dako, Golstrup Danimarca)¹¹⁵. Ciascun marcatore è stato considerato positivo se espresso da almeno il 20% delle cellule neoplastiche. Il cut-off per FOXP-1 e Survivina è stato stabilito ad un valore del 30%^{116,117}.

3.4 Ibridazione in situ

FISH: dal TMA sono state tagliate sezioni di 4 µm di spessore. Dopo sparaffinatura (3 passaggi in Histoclear per 10 minuti), le sezioni sono state poste in alcol 100 (2 cicli da 5 minuti). I vetri sono stati poi messi in pentola a pressione dove precedentemente sono stati portati ad ebollizione 1 L di acqua distillata e 2 ml di EDTA 0.5M a pH 8. I vetri sono stati quindi rimossi dopo 4 minuti dalla sfiatatura della pentola e fatti raffreddare sotto acqua corrente. Sono stati trasferiti in una soluzione contenente 50 ml di HCl 0.01 M e 5 mg di pepsina A (*Sigma*), a 37°C per 14 minuti, poi messe in formalina per 10 minuti e infine in alcol (tre passaggi di 1 minuto negli alcoli 70, 80, 100). L'ibridazione è stata effettuata mediante l'uso della *Hybrite machine*: le sezioni sono state denaturate insieme alle sonde (LSI IgH/MYC cep8 Tri-color Dual Fusion Translocation Probe, e BCL2 (18q21) Dual color Break Apart Rearrangement Probe, *Vysis Abbott Laboratories*) a 80°C per 22 minuti, poi ibridate a 38°C per 22 ore. Il giorno successivo le sezioni sono state lavate prima in soluzione 0.4 X SSC/0.3%NP40 a 73°C, per 2 minuti, e poi in 2 X SSC/0.1%NP40 a temperatura ambiente, lasciando i vetri in incubazione per 1 minuto. Infine, dopo contro-colorazione con *DAPI*, le sezioni sono state coperte con un vetrino ed analizzate con un microscopio ottico *Olympus BX61* (Olympus, Japan). L'affidabilità delle sonde e del sistema è stata validata costantemente, mediante il confronto con controlli positivi e negativi. Il cut-off delle sonde è stato stabilito a 5.4% e 12.6 per BCL2 e c-MYC rispettivamente, utilizzando linfonodi reattivi come controlli.

EBER: per la ricerca dell'EBV è stato utilizzato il DNA ISH Detection kit K5201 (DAKO).

4. Risultati

4.1 Dati clinici

Dei 50 pazienti esaminati, 42 erano di sesso maschile e 8 di sesso femminile con rapporto maschio/femmina (M/F) pari a 5.25/1. L'età media è stata di 48 anni, con intervallo compreso tra 4 e 70 anni. Quarantotto pazienti hanno ricevuto un TOS (cuore: 25; fegato: 12; rene: 6; polmone: 5) e i restanti due un allo-TMO. Laddove note, le malattie predisponenti al trapianto sono state le seguenti: cardiomiopatia ischemica (3 casi), cardiomiopatia dilatativa conseguente ad infarto acuto del miocardio (10 casi), cirrosi virus-correlata (11 casi), cirrosi biliare primitiva (1 caso), nefropatia associata a Lupus Eritematoso Sistemico (1 caso), sindrome di Prune-Belly (1 caso), fibrosi cistica polmonare (3 casi), fibrosi polmonare idiopatica (1 caso) e leucemia/linfoma linfoblastico di derivazione dai precursori T (1 caso). Tutti i pazienti hanno ricevuto una terapia immunosoppressiva con l'impiego di uno o più farmaci tra loro combinati, allo scopo di evitare un rigetto; il farmaco di più frequente utilizzo è stata la CsA. L'intervallo temporale intercorso tra il momento del trapianto e lo sviluppo delle lesioni oscillava da 2 a 158 mesi. In particolare, i casi EBV-positivi hanno mostrato una latenza variabile da 4 a 158 mesi, ma in 22 pazienti (74%) l'intervallo è stato inferiore a 5 anni. Le sedi anatomiche coinvolte dalla malattia sono risultate: linfonodi (17 casi), fegato (5 casi, tutti corrispondenti a pazienti trapiantati di fegato), cute (3 casi), polmone (3 casi, di cui 2 rappresentati dal graft), tonsilla, milza, piccolo intestino, stomaco, mesentere, cavità nasale (2 casi ciascuno), rene (sede del graft), cuore, grosso intestino, retro-peritoneo, peritoneo, lingua, cavità orale e midollo osseo (1 caso ciascuno), sedi multiple (2 casi: linfonodo + milza; linfonodo + cute). Trentadue (64%) pazienti sono deceduti e diciassette (34%) sono attualmente vivi e liberi da malattia, compresi i due pazienti affetti da LB. Solo in un caso il paziente è risultato perso al follow-up. Venticinque pazienti (78%) sono deceduti per progressione di malattia; nei rimanenti 7, il decesso è stato causato da shock settico con insufficienza multi-organo in 2 casi, aritmia fatale, complicanze post-chirurgiche, emorragia gastro-intestinale massiva, polmonite acuta e necrosi emorragica del colon, nei restanti.

4.2 Istologia ed immunoistochimica

a) Linfoma B diffuso a grandi cellule

Sulla base delle caratteristiche morfologiche¹ i casi diagnosticati come DLBCL risultavano suddivisi in 17 centroblastici, 17 immunoblastici, 8 plasmoblastici, 6 anaplastici e 2 linfomi a grandi cellule B ricchi in linfociti T reattivi (Fig.1b-1e). Tutti mostravano espressione di molecole B-associate (Fig.1g e 1h). Sulla base del profilo immunoistochimico¹¹⁸, questi casi sono stati ulteriormente sottoclassificati in: 23 ABC-DLBCL (46%) (Fig.2a e 2c), 8 GCB-LBDGC (16%) (Fig.1l-1n) e 11 NC-LBDGC (22%) (Fig.1o-1q). Nei restanti 8 casi (16%) non è stato possibile definire il fenotipo a causa della perdita del “core” bioptico o della sub-ottimale preservazione antigenica. Per quanto riguarda l'espressione delle catene leggere delle immunoglobuline, 24 casi (48%) sono risultati monotipici per lambda (Fig.2b), 9 (18%) per kappa e 9 (18%) non presentavano sintesi immunoglobulinica (con controlli interni in plasmacellule reattive). La maggior parte delle cellule neoplastiche esprimeva i fattori di trascrizione OCT2 (Fig.2d) e BOB1 (Fig.2e); il primo marcatore è risultato positivo in 47 casi (94%) e non valutabile in 3, mentre il secondo, positivo in 43 (86%) e non valutabile in 7 casi. In tutti i casi l'indice di proliferazione Ki-67/Mib-1 risultava superiore al 50% degli elementi neoplastici (Fig.1i). Per quel che concerne i fattori prognostici, 40 casi (80%) hanno mostrato espressione di PKC-beta (Fig.2f), 26 (52%) di ciclina D2 (Fig.2g), 20 (40%) di Survivina (Fig.2h), 18 (35%) di FOXP-1 (Fig.2i), 15 (30%) di p27; negativa la ciclina D3 (Fig.2l). LMP-1 (Fig.2n) è risultato positivo in 16 casi (32%), mentre HHV-8 in un solo caso di linfoma con profilo attivato (Fig.2m).

b) Linfoma di Burkitt

Due casi mostravano le caratteristiche istologiche di un LB tipico (Fig.1f). La caratterizzazione immunoistochimica ha dato risultati coerenti con tale diagnosi (CD20⁺, CD10⁺, Bcl-6⁺, Bcl-2⁻, e Ki-67/Mib-1 prossimo al 100%). Un caso è apparso monotipico per la catena leggera lambda e positivo per BOB1, OCT2 e PKC-beta, ma negativo per i restanti fattori prognostici; l'altro caso non presentava restrizione per le catene leggere delle immunoglobuline e risultando positivo solo per OCT2 e FOXP1.

4.3 Ibridazione *in situ*

FISH-BCL2: Sono risultati valutabili 22 “cores” (per esaurimento del materiale biotico o distacco durante l’allestimento), dei quali 8 (36%) con l’evidenza di un’amplificazione per BCL2. I casi corrispondevano a 5 ABC-DLBCL e 3 NC-DLBCL (Fig.2q).

FISH-cMYC: Sono risultati valutabili 17 “spots” (per esaurimento del materiale biotico o distacco durante l’allestimento, compresi i 2 casi di LB). Un solo caso dei 17 valutabili ha mostrato evidenza di un riarrangiamento per c-MYC [t(8;14)], corrispondente ad un GCB-DLBCL.

EBER: Trenta DLBCL (60%) su 50 hanno mostrato l’integrazione dell’EBV mediante sonda con una corrispondente espressione all’indagine immunoistochimica (LMP-1). Dei 2 LB, 1 caso ha dato esito positivo, mentre il secondo è risultato non valutabile. In accordo con quanto riportato in letteratura i casi EBV-positivi hanno mostrato un esordio precoce (<1 anno) rispetto al trapianto o mai superiore ai 5 anni¹¹⁹ (Fig.2p).

5. Discussione

Lo studio è stato focalizzato sul profilo fenotipico e molecolare del linfoma B aggressivo post-trapianto, con particolare riferimento al linfoma B diffuso a grandi cellule. Nei Paesi Occidentali e in condizioni di immunocompetenza, questo istotipo costituisce il 25-30% dei LNH dell'adulto, mostrando un'altrettanto elevata incidenza nei Paesi in via di sviluppo. L'età media si attesta intorno alla 7^a decade, ma l'intervallo è molto ampio, dal momento che queste forme possono comparire anche in età pediatrica^{120,121}. In accordo con le recenti acquisizioni in termini di profilo genico^{65,122} ed immunoistochimico¹¹⁸ i DLBCL sono stati ulteriormente distinti in "GCB" e "ABC". Il primo gruppo, che costituisce il 45-50% dei casi, mostra un profilo di espressione genica che ricorda quello delle cellule del centro germinativo, mentre il secondo (30% dei casi) il profilo delle cellule B attivate in vitro. Il terzo gruppo (NC) comprende una collezione di casi intermedi ai primi due e non corrisponde ad un'entità distinta^{123,124}. I due gruppi sono associati a differenti aberrazioni cromosomiche^{125,126} e diversa prognosi dopo terapia¹²⁷. L'espressione di BCL2 può avere un impatto prognostico più sfavorevole e condizionare il peggior andamento clinico dei "ABC-DLBCL"¹²⁸. Alcuni studi hanno mostrato che pazienti con un fenotipo "GCB", immunoistochimicamente determinato, trattati con R-CHOP hanno una prognosi significativamente migliore rispetto al gruppo "non-GCB"^{129,130}.

Nel nostro studio, fra i DLBCL post-trapianto, quelli con fenotipo ABC sono stati i più rappresentati e, come riportato in letteratura^{131,132}, tipicamente correlati con un decorso clinico aggressivo ed una prognosi fatale. Infatti, 17 dei 23 pazienti sono deceduti e in 14 casi (82%) per progressione di malattia, con diffusione sistemica nodale ed extranodale e status leucemico. Nei restanti 3 casi l'exitus è sopraggiunto per complicanze non ematologiche (aritmia fatale, necrosi emorragica del colon e polmonite acuta). Negli altri due gruppi i decessi imputabili a malattia sono stati quantitativamente più ridotti: 3 (37.5%) e 7 (64%) nelle forme "GCB" e "NC" rispettivamente.

Il ruolo patogenetico dell'EBV nell'induzione di un PTLD è un dato ampiamente documentato in letteratura¹³³. L'80% dei B-PTLD sono EBV positivi, mentre le forme negative sono, più spesso, proliferazioni ad insorgenza tardiva, ad eziologia

sconosciuta, di natura T-cellulare e clinicamente più aggressive¹³⁴. Nei riceventi EBV-negativi è possibile osservare una rapida siero-conversione in caso di trapianto da donatori positivi mentre il rischio di sviluppare un linfoma è alto nel primo anno (224/100.000), per diminuire negli anni successivi (54/100.000 nel secondo e 31/100.000 nel terzo anno). Da un punto di vista eziopatogenetico, i PTLD si manifestano nel contesto di una prolungata e profonda immunosoppressione che riduce la quota di linfociti T-citotossici EBV-specifici, favorendo la proliferazione incontrollata dei linfociti B infetti e lo sviluppo del processo patologico. Lawrence e colleghi¹³³ evidenziano come le forme EBV-positive mostrino più spesso un profilo non-GCB; la spiegazione potrebbe risiedere nell'effetto che il virus induce sui linfociti B, stimolando da un punto di vista istogenetico gli stati tardivi della maturazione B-cellulare (post-GC). Nel nostro studio, infatti, la ricerca dell'EBV mediante ibridazione *in situ* è risultata positiva in 30 casi, così ripartiti rispetto ai 3 gruppi: 16 (53%) del tipo "ABC", 2 (7%) del tipo "GCB" e 9 (30%) del tipo "NC". I restanti 3 corrispondono a casi con fenotipo non valutabile.

Questi linfomi inoltre mostrano caratteristiche anatomo-cliniche sovrapponibili ai disordini linfo-proliferativi (DLP) "senili" EBV-associati¹³⁵, dove l'età (>60 anni) sembra avere un ruolo eziopatogenetico predominante, in assenza di una causa riconoscibile di immunosoppressione. Infatti, nei DLP "senili" le sedi interessate (più spesso extranodali) appaiono simili a quelle dei pazienti immunosoppressi, trattati con ciclosporina o sottoposti a TMO. E' pertanto ipotizzabile che tali proliferazioni possano costituire un "continuum" con i DLP associati ad immunodeficienza, sebbene i meccanismi patogenomnici debbano essere ulteriormente approfonditi. Al contrario i PTLD EBV-negativi sembrano avere maggiori somiglianze con i linfomi del soggetto immunocompetente.

In accordo con quanto riportato dalla letteratura, la FISH ha confermato la presenza di aberrazioni cromosomiche. Un solo caso ha mostrato riarrangiamento per c-MYC^{1,6} con una positività pari al 68% delle cellule neoplastiche, corrispondente ad un paziente portatore di un linfoma a fenotipo "GCB" e attualmente vivente. Il dato rimane tuttavia circostanziale per il fatto che la lettura è avvenuta su un numero limitato di campioni bioptici, dovuto in larga parte ad esaurimento del materiale posto sui TMA. Per quanto concerne BCL2, in 8 casi su 22 valutabili, è stata identificata l'amplificazione del gene¹²⁸. Immunofenotipicamente, i casi corrispondono a 5 forme attivate e 3 non

classificabili, caratterizzate dall'espressione immunoistochimica della proteina corrispondente. Questa osservazione corrisponde a quanto dimostrato nell'unico lavoro che ha fino ad oggi valutato lo stato di BCL2 nei DLBCL del soggetto immunocompetente¹²⁸. Essa appare di notevole interesse dal momento che, rispetto al soggetto non immunodepresso, l'anomalia occorre nel soggetto con PTLD con analoga frequenza e correlazione con il fenotipo non-GCB. Questo suggerisce che l'amplificazione di BCL2 possa costituire un meccanismo patogenetico indipendente dallo stato del sistema immunitario, che specificamente occorre nelle forme di DLBCL istogeneticamente non correlate agli elementi del centro germinativo.

Fattori prognostici

La discussione di tali fattori non può prescindere dalla ricapitolazione del loro significato nel DLBCL osservato nel paziente immunocompetente. Infatti, fino ad ora la loro ricerca non è stata mai applicata a casi inquadrabili nell'ambito dei PTLD.

Ciclina D2

È una proteina regolatoria coinvolta nel passaggio tra le fasi G1 e S del ciclo cellulare, detto anche "punto di restrizione" poiché la cellula viene irreversibilmente commissionata per la duplicazione del DNA e la divisione mitotica. Le cicline D (D1, D2, D3) fungono da subunità catalitiche per le chinasi ciclina-dipendente (CDK) 4/6, dimostrando di possedere un ruolo "chiave" nella progressione del ciclo cellulare e nel mantenimento di normali livelli di crescita e proliferazione cellulare¹³⁶. Nello specifico, la ciclina D2 contribuisce alla maturazione dei linfociti B e risulta fisiologicamente espressa nei nuclei delle cellule B vergini (CD27⁻) e di memoria (CD27⁺) tonsillari oltre che nelle cellule T interfollicolari nodali; è invece assente nei centroblasti e centrociti del centro germinativo¹³⁷. L'espressione nei DLBCL correla con una prognosi sfavorevole con sopravvivenza globale piuttosto limitata, pari a 15 mesi nei casi positivi rispetto a 65 mesi nei casi negativi, secondo gli studi più recenti¹³⁸. Nel nostro studio i GCB-DLBCL sono risultati negativi alla determinazione di questo anticorpo con l'eccezione di un unico caso mostrante una debole e sporadica espressione. I casi positivi fanno riferimento a forme attivate o non classificabili, che hanno mostrato simultanea espressione della proteina PKC-beta (vedi di seguito).

PKC-beta

E' un componente della famiglia delle serina/treonina-chinasi coinvolto nella trasduzione del segnale e nella differenziazione e proliferazione cellulare¹³⁹. E' fisiologicamente espresso dai linfociti della zona marginale e della zona mantellare, a livello citoplasmatico. Come per ciclina D2, l'espressione di PKC- β nei LBDGC correla con una peggiore prognosi; lo stesso si osserva in pazienti con contemporanea espressione delle due molecole, dove la sopravvivenza complessiva si aggira intorno ai 16 mesi¹³⁹, indipendentemente dall'IPI (International Prognostic Index). PKC-beta è risultato il marcatore più frequentemente espresso, essendo positivo in entrambi i LB, in circa l'80% delle forme attivate e nel 50% dei linfomi tipo "GCB". Venticinque pazienti hanno mostrato simultanea positività per ciclina D2, dei quali 15 (con l'eccezione di un unico paziente sopravvissuto oltre 3 anni) sono deceduti entro 1 anno dall'insorgenza del linfoma, confermando il dato di una maggiore aggressività biologica per queste forme¹³⁶.

Ciclina D3

E' un membro della famiglia delle cicline D, insieme a ciclina D1 e D2. Le cicline D, formando complessi con le CDK4 e CDK6, promuovono la fosforilazione e la conseguente inattivazione della proteina del gene del retinoblastoma (pRb), consentendo in tal modo il passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. In condizioni di normalità la proteina ha una localizzazione nucleare e risulta positiva nei centroblasti, nei linfociti della zona mantellare e marginale del follicolo linfoide e nei macrofagi perisinusoidali¹³⁷. Filipits¹⁴⁰ ha correlato l'espressione di ciclina D3 nei DLBCL con i dati clinico-laboratoristici, la risposta alla chemioterapia e la sopravvivenza. Con un intervallo di positività variabile da 0 a 100% degli elementi neoplastici ha distinto casi ad alta (>50%) e a bassa reattività (<50%); clinicamente, i casi con elevata espressione di ciclina D3 corrispondevano a pazienti con malattia in stadio avanzato e multiple localizzazioni extranodali. Inoltre, erano presenti significative differenze nella proporzione di pazienti con alti livelli di ciclina D3 e le 4 categorie di rischio (basso, medio-basso, medio-alto e alto) secondo IPI. Dopo chemioterapia convenzionale le risposte parziali corrispondevano a pazienti con alti livelli di ciclina; infine la sopravvivenza a 3 anni dei pazienti con alta reattività risultava significativamente minore rispetto a pazienti con bassi livelli, sia negli stadi I-

II di malattia (38% vs 80%) che III-IV (11% vs 65%). In conclusione l'alto livello di ciclina D3 è un fattore prognostico indipendente associato a prognosi infausta nei linfomi B aggressivi.

Ai fini del presente studio Ciclina D3 è non risultata significativa, essendo negativa o non affidabilmente valutabile.

p27/KIP1

E' una fosfoproteina appartenente ad una famiglia di inibitori (KIP) delle CDK, coinvolta nel passaggio da G1 a S del ciclo cellulare. Normalmente è espressa dai nuclei dei piccoli linfociti quiescenti (zona mantellare e linfociti interfollicolari), mentre è assente nelle cellule proliferanti del centro germinativo. Questi aspetti trovano spiegazione nell'inversa correlazione esistente tra p27 e frazione di crescita Ki-67/Mib1, confermando il ruolo di p27 come regolatore negativo nella progressione del ciclo cellulare. Questo ruolo è, inoltre, supportato dai dati raccolti studiando l'espressione di p27 nei tumori umani, dove la perdita della proteina assume un significato prognostico sfavorevole associato con progressione di malattia¹⁴¹. Il pattern di espressione di p27 nei linfomi B aggressivi non è totalmente coerente con queste osservazioni. Sebbene la maggior parte dei DLBCL mostri debole o assente positività, sono stati descritti casi con iper-espressione, legati ad incapacità di p53 di trans-attivare p21 e MDM2¹⁴². Nel gruppo dei DLBCL l'iper-espressione di p27 è ugualmente un fattore prognostico avverso, indipendente da altri parametri clinici.

Survivina

La Survivina è un componente della famiglia IAP (Inibitori delle Proteine dell'Apoptosi) con funzione sia di inibitore dell'apoptosi che di regolatore della divisione cellulare, nel passaggio G2-M. E' prevalentemente espressa durante lo sviluppo fetale, quando la replicazione cellulare è più sollecitata, mentre la sua espressione si riduce nei tessuti differenziati. Nei linfonodi, identifica le cellule della zona scura (c.d. "dark zone") del centro germinativo, localizzandosi a livello nucleare. Nella caratterizzazione dei DLBCL è ancora una volta un fattore prognostico negativo se espressa in almeno il 30% delle cellule neoplastiche, indipendentemente dall'IPI^{143,144}.

Survivina ha dato ugual esito nei due principali sottogruppi; dei 20 pazienti con

espressione della molecola, 13 sono deceduti.

FOXP1

FOXP-1 (Forkhead box P-1) è uno dei fattori di trascrizione appartenenti alla superfamiglia FOXP1-4. I membri di tale famiglia contengono un sito di legame al DNA composto da un dominio “a forchetta” (forkhead) associato a un dominio a “dita di zinco” e un dominio a “cerniera di leucina”. Fisiologicamente, FOXP-1 svolge un ruolo in vari ambiti del sistema immunitario, controllando ad esempio la sopravvivenza linfocitaria o lo sviluppo timico¹⁴⁵. Nei DLBCL, l’espressione di questo marcatore correla con una prognosi decisamente sfavorevole. Nei pazienti FOXP-1 positivi, il trattamento chemioterapico è più spesso inefficace, la malattia progredisce o recidiva rapidamente e la sopravvivenza è drammaticamente ridotta^{145,116}.

La molecola FOXP-1 è stata più frequentemente riscontrata nelle forme “GCB” rispetto a quelle attivate (62% vs 17% rispettivamente). Dieci dei 18 pazienti FOXP-1-positivi sono deceduti a dispetto del fenotipo favorevole, in accordo con quanto riportato da Banham¹¹⁶ dove la proteina è risultata comunemente espressa nel sottotipo “GCB”, identificando una categoria di pazienti anziani, con malattia diffusa, IPI sfavorevole e sopravvivenza limitata. Tali dati tuttavia non vengono confermati da Barrans¹⁴⁶ dove l’espressione di FOXP-1 è stata dimostrata in un gruppo di DLBCL non-GCB, esprimenti IRF-4 e Bcl-2, caratterizzati da assenza di t(14;18) e da una prognosi particolarmente sfavorevole.

Conclusioni

I PTLD monomorfi sono linfomi biologicamente aggressivi, gravati da un alto tasso di mortalità. Il processo neoplastico è favorito da una profonda e prolungata immunosoppressione che altera il sistema immunitario dell'ospite e consente, in pazienti precedentemente esposti, la riattivazione dell'EBV. Quest'ultimo si è dimostrato il fattore di rischio più importante nel predire lo sviluppo di un disordine linfo-proliferativo post-trapianto. La malattia non mostra significative correlazioni con età, sesso, sede anatomica del linfoma e tipo di trapianto.

Il presente studio dimostra per la prima volta in letteratura come i DLBCL, che occorrono nel paziente sottoposto a terapia immunosoppressiva per trapianto d'organo, presentino delle caratteristiche molecolari e fenotipiche raffrontabili a quelle degli stessi tumori che insorgono nel soggetto immunocompetente. In particolare, analogamente a questi ultimi, presentano un'elevata incidenza di amplificazioni del gene BCL2, che tipicamente correlano con il fenotipo non-GCB. Inoltre, rivelano espressioni fenotipiche (PKC-beta, ciclina D2, FOXP1, Survivina) che sono provviste di valenza prognostica. Fra queste, particolare interesse rivestono PKC-beta e FOXP1, le quali appaiono predittive di un decorso decisamente sfavorevole, non correlabile con il sottotipo prognostico e con una sopravvivenza significativamente inferiore rispetto alla media attesa anche per DLBCL di tipo "GCB". Dal momento che dette espressioni molecolari risultano determinabili al momento della diagnosi, appare legittimo domandarsi se per i pazienti che ne sono portatori debbano essere sviluppate strategie terapeutiche differenziate rispetto a quelle "standardizzate" applicate ai soggetti che ammalano di tale patologia.

6. Tabelle e figure

anticorpo	diluizione	clone	codice	produttore	smascheramento antigenico
CD3	1:250	SP7	RM-9107-S	NeoMarkers	EDTA 750W
CD5	1:10	54/F6	M7194	Dako	EDTA 900W
CD4	1:30	OPD4	M0834	Dako	EDTA 750W
CD8	1:5	144B		Dako	EDTA 750W
CD10	1:5	56C6	NCL-CD10-270	NovoCastr	EDTA 900W
CD20	1:200	L26	M0755	Dako	EDTA 750W
CD21	1:5	1F8	M0784	Dako	proteolitico
CD30	1:3	Ber-H2		Prof.Falini§	EDTA 900W
CD138	1:20		RB-9422-P1	NeoMarkers	EDTA 900W
CD45	1:100	LCA	M0701	Dako	EDTA 750W
CD68 / PG-M1	1:5	PG-M1		Prof. Falini	EDTA 750W
CD79a	1:8	JCB117		Dako	EDTA 750W
proteina S100	1:2000		Z0311	Dako	EDTA 750 W
Bcl2	1:3	124		Dako	EDTA 900W
Bcl6		PG-B6p		Prof. Falini	EDTA 900W
IRTA-1	1:2	Mum 2EC		Prof .Falini	EDTA 900W
IRF4	1:2			Prof .Falini	EDTA 900W
catena Kappa	1:30000		A0192	Dako	EDTA 750W
catena Lambda	1:30000		A0194	Dako	EDTA 750W
Oct-2	1:600	C-20	SC-233	Santa Cruz	EDTA 900W
Bob-1	1:250	C-20	SC-955	Santa Cruz	EDTA 900W
Pu-1	1:30	G148-74	554268	DB Pharmigen	EDTA 900W
ciclina D2	1:120	M-20	SC-593	Santa Cruz	citrato 900W
ciclina D3	1:160	D-7	SC-6283	Santa Cruz	citrato 900W
P27	1:10	F-8	SC-1641	Santa Cruz	EDTA 900W
P53	1:30	DO7	NCL-p53-DO7	Novocastra	EDTA 900W
FOXP-1	1:40	JC12		Dako	EDTA 900W
Survivina	1:20	D-8	SC-17779	Santa Cruz	citrato 900W
PKC-β	1:120	C-18	SC-210	Santa Cruz	EDTA 900W
HHV-8	1:10	13B10	NCL-HHV8LNA	Novocastra	EDTA 750W
LMP-1	1:10	CS 1-4	M0897	Dako	proteolitico
EBNA-2	1:10	PE2	M7004	Dako	EDTA 750W
Ki-67	1:20	Mib-1	M7240	Dako	EDTA 900W

Tabella 1: Lista degli anticorpi utilizzati nello studio.

§ Gentile concessione del Prof. Brunangelo Falini, Università di Perugia (Italia)

Legenda alle figure

Figura 1

a. Esempio di TMA (giemsa, x100); **b.** Variante immunoblastica (giemsa, x400); **c.** Variante immunoblastica con differenziazione plasmacellulare (giemsa, x200); **d-e.** M-PTLD plasmoblastici (giemsa, x400); **f.** Linfoma di Burkitt tipico (giemsa, x200); **g.** Diffusa espressione per CD20 (APAAP, x400); **h.** Immunocolorazione per CD79alfa (APAAP, x400); **i.** Elevata frazione di crescita Ki-67/MIB1 (APAAP, x200); **l-n.** GCB-DLBCL: nell'ordine positività per CD10 e Bcl6 e negatività per Bcl2 (APAAP, x200 x400); **o-q.** Fenotipo post-GCB: nell'ordine negatività per CD10 e intensa espressione di IRF4 e Bcl2 (APAAP, x200 x400).

Figura 2

a. Diffusa positività per CD138 nelle forme ABC (APAAP, x400); **b.** Esempio di monoclonalità per la catena leggera lambda delle immunoglobuline (APAAP, x400); **c.** Espressione della molecola CD30 nei ABC-DLBCL (APAAP, x400); **d-e.** Positività dei fattori di trascrizione OCT2 e BOB1 rispettivamente (APAAP, x400); **f.** Intensa immunoreattività per PKC-beta (APAAP, x400); **g.** Positività per ciclina D2 (APAAP, x200); **h-i.** Esempi di positività per Survivina e FOXP1 (En-Vision⁺, x200); **l.** Negatività per ciclina D3 (En-Vision⁺, x400); positività degli antigeni virali: **m.** HHV-8 (APAAP, x200); **n.** LMP-1 (APAAP, x400); **o.** EBNA-2 (APAAP, x400); **p.** EBER (ibridazione *in situ*); **q.** Amplificazione di BCL2 (FISH).

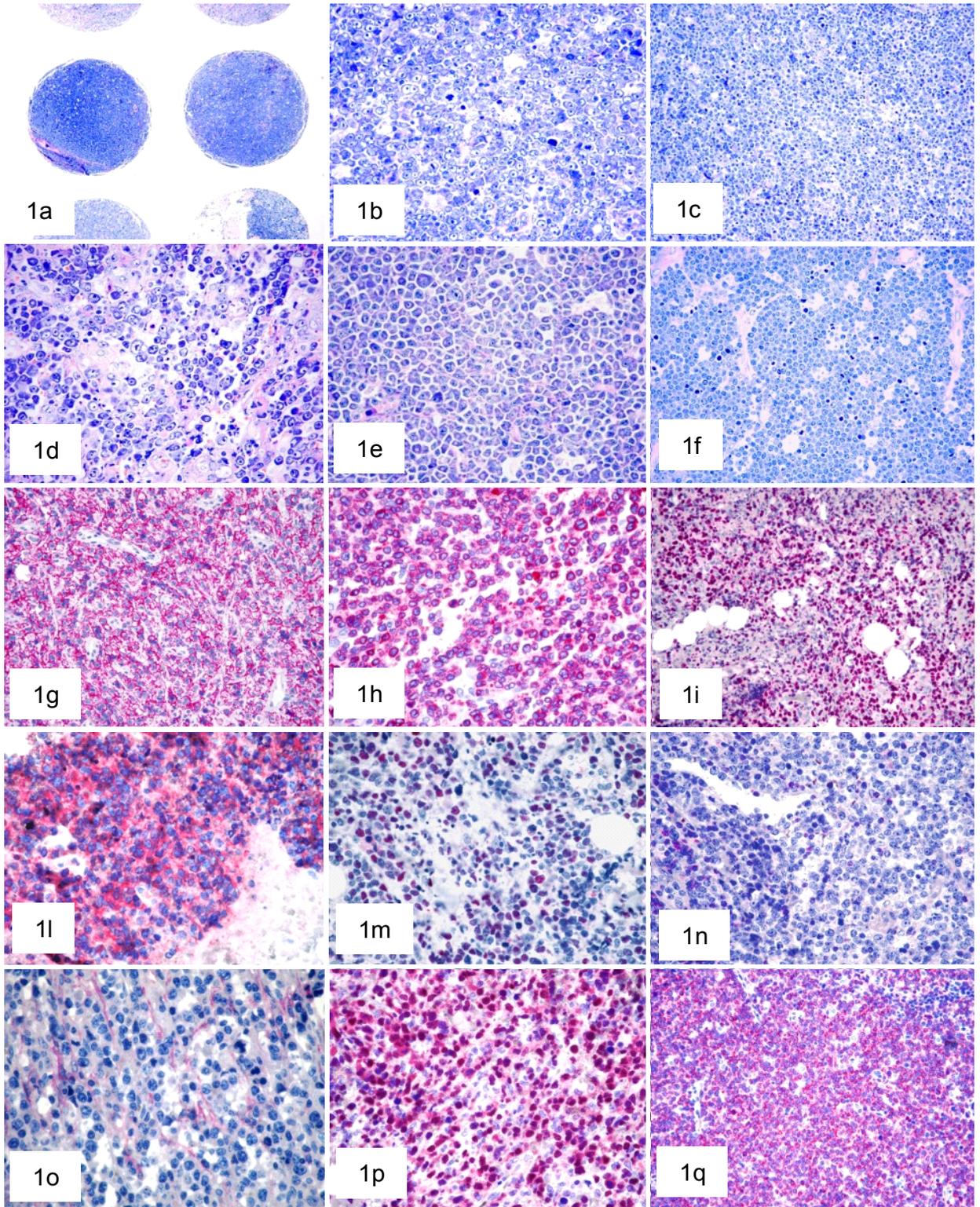


Figura 1

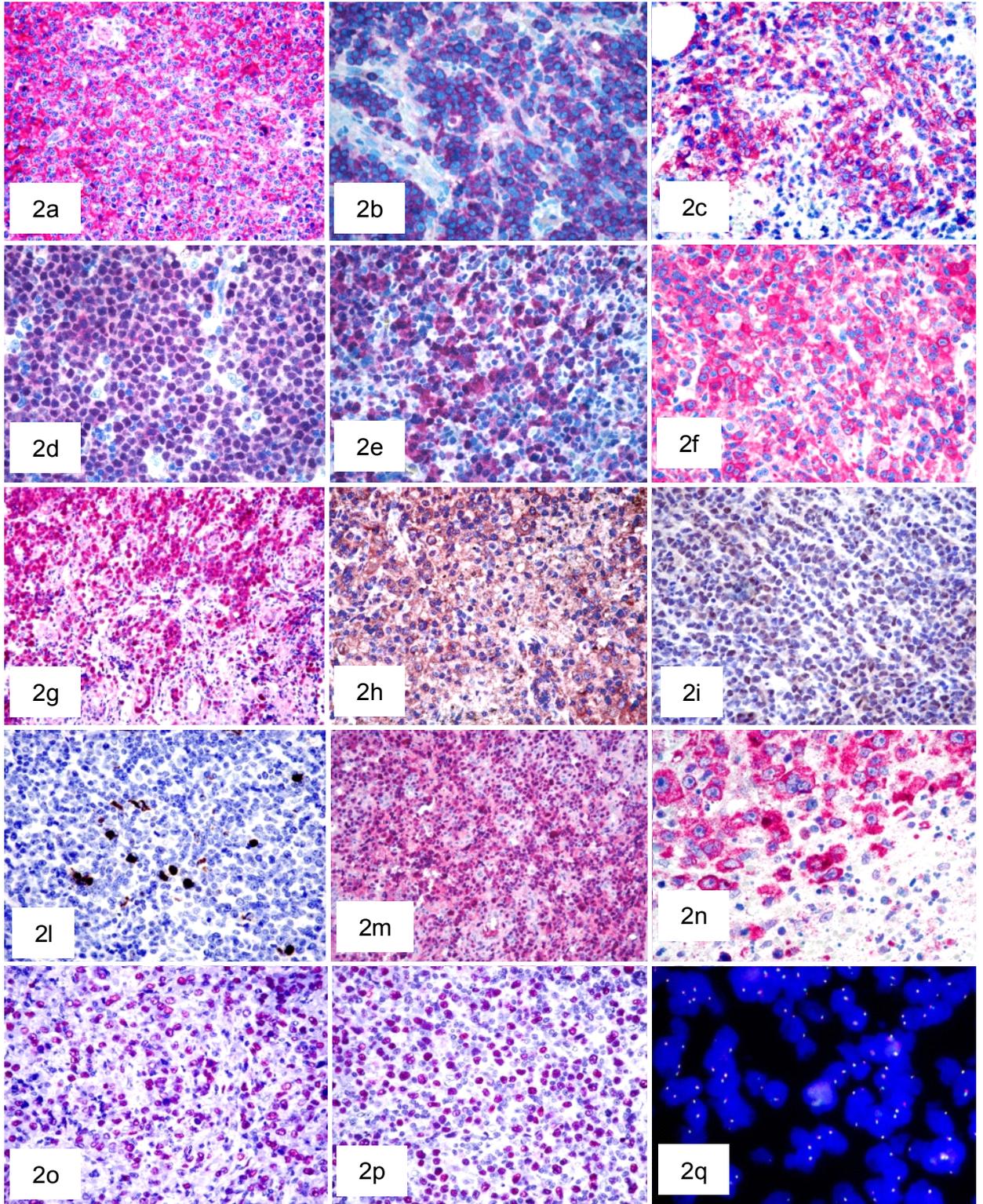


Figura 2

7. Bibliografia

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. *World Health Organization Classification of Tumors*, vol.4. Lione, France; IARC Press, 2008
2. Frank D, Cesarman E, Chadburn A. Posttransplantation lymphoproliferative disorders frequently contain type A and not type B Epstein-Barr virus. *Blood*. 1995; 85(5):1396-403
3. Nalesnik MA, Jaffe R, Starzl TE. The pathology of PTLD occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol*. 1988; 133:173-92
4. Cleary ML, Warnke R, Sklar J. Monoclonality of lymphoproliferative lesions in cardiac-transplant recipients. Clonal analysis based on immunoglobulin-gene rearrangements. *N Engl J Med*. 1984; 310(8):477-82
5. Ferry JA, Jacobson JO, Conti D. Lymphoproliferative disorders and hematologic malignancies following organ transplantation. *Mod Pathol*. 1989; 2(6):583-92
6. Knowles DM, Cesarman E, Chadburn A. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of PTLD. *Blood*. 1995; 85:552-65
7. Chadburn A, Chen JM, Hsu DT. The morphologic and molecular genetic categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders are clinically relevant. *Cancer*. 1998; 82(10):1978-87
8. Taylor A, Marcus R, Bradley A. PTLD after solid organ transplantation. *Oncology/Hematology*. 2005; 56:155-67
9. Starzl TE. Five years experience in renal transplantation with immunosuppressive drugs: survival, function, complications and the role of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula. *Ann Surg*. 1968; 168:416
10. Briggs JD, Canavan JS, Dick HM. Influence of HLA matching and blood transfusion on renal allograft survival. *Transplantation*. 1978; 25:80-85
11. Ziarkiewicz-Wroblewska B, Górnicka B, Suleiman W. PTLD: morphological picture and diagnostic difficulties. *Transplant Proc*. 2006; 38:168-72

12. Tsao L, Hsi ED. The clinicopathologic spectrum of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Arch Path Lab Med.* 2007; 131:1209-18
13. Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant.* 2004; 4:222-30
14. Martin-Gomez MA, Pena M, Cabello M. PTLD: a serie of 23 cases. *Transplant Proc.* 2006; 38:2448-50
15. Caillard S, Lelong C, Pessione F. Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry. *Am J Transplant.* 2006; 6(11):2735-42
16. Caillard S, Dharnidharka V, Agodoa L. Posttransplant lymphoproliferative disorders after renal transplantation in the United States in era of modern immunosuppression. *Transplantation.* 2005; 80(9):1233-43
17. Bakker NA, van Imhoff GW, Verschuuren EA. Early onset post-transplant lymphoproliferative disease is associated with allograft localization. *Clin Transplant.* 2005; 19(3):327-34

18. Dharnidharka VR, Tejani AH, Ho PL. PTLD in the United States: young Caucasian male are at highest risk. *Am J Transplant.* 2002; 2:993-98
19. Lowe T, Bhatia S, Somlo G. Second malignancies after allogenic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007; 13:1121-34
20. Curtis RE, Travis LB, Rowlings PA. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. *Blood.* 1999; 94(7):2208-16
21. Libertiny G, Watson CJ, Gray DW. Rising incidence of PTLD in kidney transplant recipients. *Br J Surg.* 2001; 88:1330-34
22. Gao SZ, Chaparro PN, Perlroth M. PTLD in heart and heart-lung transplant recipients: 30-years experience at Stanford University. *J Heart Lung Transplant.* 2003; 22:505-14
23. Boubenider S, Hiesse C, Goupy C. Incidence and consequence of PTLD. *J Nephrol.* 1997; 10:136-45
24. Opelz G, Henderson R. Incidence of non-Hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *Lancet.* 1993; 342: 1514-16
25. Cox KL, Lawrence-Miyasaki LS, Garcia-Kennedy R. An increased incidence of EBV infection and lymphoproliferative disorder in young children on FK506 after liver transplantation. *Transplantation.* 1999; 59:524-29
26. Reding R, Wallemacq PE, Lamy ME. Conversion from cyclosporine to FK506 for salvage of immunocompromised pediatric liver allografts. Efficacy, toxicity, and dose regimen in 23 children. *Transplantation.* 1994; 57: 93-100
27. Younes BS, McDiarmid SV, Martin MG. The effect of immunosuppression on PTLD in pediatric liver transplant patients. *Transplantation.* 2000; 70:94-9
28. Cao S, Cox KL, Berquist W. Long-term outcomes in pediatric liver recipients: comparison between cyclosporin A and tacrolimus. *Pediatr Transplant.* 1999; 3:22-6
29. Swinnen LJ, Costanzo-Nordin MR, Fisher SG. Increased incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med.* 1990; 323:1723-8
30. Pereira JR, Segovia J, Fuertes B. Current induction immunosuppression and post-heart transplant lymphoproliferative disorders. *Transplant Proc.* 2003; 35:2009-10
31. Socie G, Curtis RE, Deeg HJ. New malignant diseases after allogenic marrow transplantation for childhood acute leukaemia. *J Clin Oncol.* 2000; 18:348-57
32. Babel N, Vergopoulos A, Trappe RU. Evidence for genetic susceptibility towards development of posttransplant lymphoproliferative disorder in solid organ recipients. *Transplantation.* 2007; 84(3):387-91
33. Capello D, Cerri M, Muti G. Molecular histogenesis of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood.* 2003; 102(10):3775-85
34. Capello D, Rossi D, Gaidano G. PTLD: molecular basis of disease histogenesis and pathogenesis. *Hematol Oncol.* 2005; 23:61-7
35. Craig FE, Lawrence RJ, Harvey SAK. Gene expression profiling of Etein-Barr virus-positive and –negative monomorphic B-cell posttransplant lymphoproliferative disorders. *Diagn Mol Pathol.* 2007; 16: 158-68

36. Epstein MA, Henle G, Achong BG. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblast from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med.* 1965; 121:761-70
37. Pattle SB, Farrel PJ. The role of Epstein-Barr virus in cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2006; 6(11):1193-205. Review
38. Gaidano G, Carbone A. Primary effusion lymphoma: a liquid phase lymphoma of fluid filled body cavities. *Adv Cancer Res.* 2001; 80:115-46
39. Damania B. Oncogenic gamma herpesviruses: comparison of viral proteins involved in tumorigenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2004; 2:656-8
40. Shivapurkar N, Harada K, Reddy J. Presence of simian virus 40 DNA sequences in human lymphomas. *Lancet.* 2002; 359:851-2
41. Vilchez RA, Madden CR, Kozinetz CA. Association between simian virus 40 and non-Hodgkin lymphoma. *Lancet.* 2002; 359:817-23
42. Capello D, Rossi D, Gaudino G. Simian virus 40 in lymphoproliferative disorders. *Lancet.* 2003; 36:88-9
43. Brousset P, deAraujo V, Gascoyne RD. Immunohistochemical investigation of simian virus 40 large T antigen in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *Int Journal Cancer.* 2004; 112:533-5
44. Rossi D, Gaidano G, Gloghini A. Frequent aberrant promoter hypermethylation of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and death-associated protein kinase genes in immunodeficiency-related lymphomas. *Br J Haematol.* 2003; 123(3):475-8
45. Bialik S, Kimchi A. DAP-kinase as a target for drug design in cancer and diseases associated with accelerated cell death. *Semin Cancer Biol.* 2004; 14(4):283-94. Review
46. Cerri M, Capello D, Muti G. Aberrant somatic hypermutation in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol.* 2004; 127(3):362-4
47. Penn I. The role of immunosuppression in lymphoma formation. *Springer Semin Immunopathol.* 1998; 20:343-55
48. Leblond V, Davi F, Charlotte F. Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity? *J Clin Oncol.* 1998; 16(6):2052
49. Nelson BP, Nalesnik MA, Bahler DW. Epstein-Barr virus-negative post-transplant lymphoproliferative disorders: a distinct entity? *Am J Surg Pathol.* 2000; 24 (3) 375-85
50. Swerdlow SH. T-cell and NK-cell posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 2007; 127 (6):887-95
51. Kahan BD, Ponticelli C, Montagnino G . In: Kahan BD, Ponticelli C. *Priciples and practice of renal transplantation.* Martin Dunitz; 2000
52. Leblond V, Sutton L, Dorent R. Lymphoproliferative disorders after organ transplantation: a report of 24 cases observed in a single center. *J Clin Oncol.* 1995; 13(4):961-8
53. Penn I, Porat G. Central nervous system lymphomas in organ allograft recipients. *Transplantation.* 1995; 59(2):240-4
54. Dunphy CH, Galambos C, Polski JM. Extranodal posttransplant plasmacytic hyperplasia with subsequent posttransplant plasmacytic malignancy: six-year case report and rewiev of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126:351-6

55. Frizzera G, Hanto DW, Gajl-Peczalska KJ. Polymorphic diffuse B-cell hyperplasias and lymphomas in renal transplant recipients. *Cancer Res.* 1981; 41:4262-79
56. Harris NL, Ferry JA, Swerdlow SH. PTLD: summary of Society for Hematopathology Workshop. *Semin Diagn Pathol.* 1997; 14:8-14
57. Vakiani E, Nandula SV, Subramaniam S. Cytogenetic analysis of B-cell posttransplant lymphoproliferations validates the World Health Organization classification and suggests inclusion of florid follicular hyperplasia as a precursor lesion. *Hum Pathol.* 2007; 38(2):315-25
58. Locker J, Nalesnik M. Molecular genetic analysis of lymphoid tumors arising after organ transplantation. *Am J Pathol.* 1989; 135(6):977-87
59. Cesarman E, Chadburn A, Liu YF. BCL-6 gene mutation in PTLD predict response to therapy and clinical outcome. *Blood.* 1998; 92:2294-302
60. Johnson LR, Nalesnik MA, Swerdlow SH. Impact of Epstein-Barr virus in monomorphic B-cell posttransplant lymphoproliferative disorders: a histogenetic study. *Am J Surg Pathol.* 2006; 30(12):1604-12.
61. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood.* 1997; 89(7):2291-7
62. Haralambieva E, Pulford KA, Lamant L. Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Haematol.* 2000; 109(3):584-91
63. Piris M, Brown DC, Gatter KC. CD30 expression in non-Hodgkin lymphoma. *Histopathology.* 1990; 17:211-8
64. Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood.* 1994; 83:1460-6
65. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE. Distinct types of DLBCL identified by gene expression profiling. *Nature.* 2000; 403(6769):503-11
66. Pasquale M, Wepler D, Smith J. Burkitt's Lymphoma variant of PTLD. *Pathol Oncol Res.* 2002; 2:105-108
67. Penn,I. The changing pattern of posttransplant malignancies. *Transplant.Proc.* 1991; 23:1101-3
68. Gentile TC, Hadlock KG, Uner AH. Large granular lymphocyte leukaemia occurring after renal transplantation. *Br J Haematol.* 1998; 101(3):507-12
69. Kontny U, Boppana S, Jung A. Post-transplantation lymphoproliferative disorder of recipient origin in a boy with acute T-cell leukemia with detection of B-cell clonality 3 months before stem cell transplantation. *Haematologica.* 2005; 90 Suppl:ECR27
70. Stadlmann S, Fenn F, Moser P. Epstein-Barr virus-associated extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type of the hypopharynx, in a renal allograft recipient: case report and review of literature. *Hum Pathol.* 2001; 32(11):1264-8. Review
71. Treaba D, Assad L, Goldberg C. Anaplastic T large cell lymphoma diagnosed by exfoliative cytology in a post renal transplant patient. *Diagn Cytopathol.* 2002; 27(1):35-7

72. Pitman,S.D., Huang,Q., Zuppan,C.W., Hodgkin lymphoma-like posttransplant lymphoproliferative disorder (HL-like PTL) simulates monomorphic B-cell PTL both clinically and pathologically. *Am J Surg Pathol.* 2006; 30(4):470-6
73. Chetty,R., Biddolph,S., and Gatter,K. An immunohistochemical analysis of Reed-Sternberg-like cells in posttransplantation lymphoproliferative disorders: the possible pathogenetic relationship to Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease and Reed-Sternberg-like cells in non-Hodgkin's lymphomas and reactive conditions. *Hum Pathol.* 1997; 28(4):493-8
74. Koike J, Yamaguchi Y, Hoshikawa M. Post-transplant lymphoproliferative disorders in kidney transplantation: histological and molecular genetic assessment. *Clin Transplant.* 2002; 16 Suppl 8:12-7
75. Gu SY, Huang TM, Ruan L. First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *Dev Biol Stand.* 1995; 84:171-7
76. Green M, Reyes J, Webber S, Rowe D. The role of antiviral and immunoglobulin therapy in the prevention of Epstein-Barr virus infection and post-transplant lymphoproliferative disease following solid organ transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 2001; 3:97-103
77. Oertel S, Anagnostopoulos I, Hummel M, Jonas S, Riess H. Identification of early antigen BZLF1/ZEBRA protein of Epstein-Barr virus can predict the effectiveness of antiviral treatment in patients with post-transplant lymphoproliferative disease. *Br. J. Haematol.* 2002; 118:1120-23
78. Riddler SA, Breinig MC, McKnight JL. Increased levels of circulating Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocytes and decreased EBV nuclear antigen antibody responses are associated with the development of posttransplant lymphoproliferative disease in solid-organ transplant recipients. *Blood.* 1994; 84(3):972-84
79. Savoie A, Perpete C, Carpentier L . Direct correlation between the load of Epstein-Barr virus-infected lymphocytes in the peripheral blood of pediatric transplant patients and risk of lymphoproliferative disease. *Blood.* 1994; 83(9):2715-22
80. Kenagy DN, Schlesinger Y, Weck K. Epstein-Barr virus DNA in peripheral blood leukocytes of patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation.* 1995; 60(6):547-54
81. Tsai D, Nearey M, Hardy C. Use of EBV PCR for the diagnosis and monitoring of post-transplant lymphoproliferative disorder in adult solid organ transplant patients. *Am J Transplant.* 2002; (10):946-54
82. Limaye A, Huang M, Atieza E. Detection of Epstein-Barr virus DNA in sera from transplant recipients with lymphoproliferative disorders. *J Clin Invest.* 1993; 91(6):2806-14
83. Tosato G, Jones K, Breinig M. Interleukin-6 production in posttransplant lymphoproliferative disease. *J Clin Invest.* 1993; 91(6):2806-14
84. Baiocchi O, Colleoni G, Caballero O. Epstein-Barr viral load, interleukin-6 and interleukin-10 levels in post-transplant lymphoproliferative disease: a nested case-control study in a renal transplant cohort. *Leuk Lymphoma.* 2005; 46(4):533-9
85. Green M, Micheals MG, Webber SA. The management of EBV associated PTL in pediatric solid organ transplant recipients. *Pediatr Transplant.* 1999; 3:271-81
86. Tsai DE, Nearey M, Hardy CL. Use of EBV PCR for the diagnosis and monitoring of PTL in adult solid organ transplant patients. *Am J Transplant.* 2002; 2:946-54
87. Savoldo B, Goss JA, Hammer MM. Treatment of solid organ transplant recipients with autologous EBV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). *Blood.* 2006; 108:2942
88. Yang J, Tao Q, Flinn JW. Characterization of EBV-infected B cell in patients with PTL: disappearance after rituximab therapy does not predict clinical response. *Blood.* 2000; 96:4055

89. Benkerrou M, Durandy A, Fischer A. Therapy for transplant-related lymphoproliferative disease. *Hematol/Oncol Clin North Am.* 1993; 7:467-75
90. Cacciarelli TV, Green M, Jaffe R. Management of PTLD in pediatric liver transplant recipients receiving primary tacrolimus (FK506) therapy. *Transplantation.* 1998; 66:1047-52
91. Gottschalk S, Rooney CM, Heslop HE. PTLD. *Annual Review of Medicine.* 2004
92. McCarthy M, Ramage J, McNair A, et al. The clinical diversity and role of chemotherapy in lymphoproliferative disorder in liver transplant recipients. *J Hepatol.* 1997; 27(6):1015–21
93. Muti G, Cantoni S, Oreste P. PTLD: improved outcome after clinico-pathologically tailored treatment. *Haematologica.* 2002; 87:67-77
94. Swinnen LJ. Treatment of organ transplant-related lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1997; 11(5):963-73. Review
95. Campbell P, Marcus R. Monoclonal antibody therapy for lymphoma. *Blood Rev.* 2003; 17(3):143–52
96. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002; 346(4):235–42
97. Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2-associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood.* 2003; 101(11):4279–84
98. Milpied N, Vasseur B, Parquet N. Humanized anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in PTLD. a retrospective analysis on 32 patients. *Ann Oncol.* 2000; 11:S113-S6
99. Faye A, Quartier P, Reguerre Y. Chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) in PTLD following stem cell transplantation in children. *Br J Haematol.* 2001; 115:112-8
100. Dotti G, Rimbaldi A, Fiocchi R. Anti-CD20 antibody (rituximab) administration in patient with late occurring lymphomas after solid organ transplant. *Haematologica.* 2001; 86:612-23
101. Benkerrou M, Jais JP, Leblond V. Anti-CD20 monoclonal antibody treatment of severe PTLD: prognostic factors and long-term outcome. *Blood.* 1998; 92:3137-47
102. Shapiro RS, Chauvenet A, McGuire W. Treatment of B-cell lymphoproliferative disorders with interferon alfa and intravenous gamma globulin. *N Engl J Med.* 1988; 318:1334
103. Smalley RV, Andersen JW, Hawkins MJ. Interferon alfa combined with cytotoxic chemotherapy for patients with non-Hodgkin lymphoma. *N Engl J Med.* 1992; 327: 1336-41
104. Hagenbeek A, Carde P, Meerwaldt JH. Maintenance of remission with human recombinant interferon alfa-2a in patients with stages III and IV low-grade malignant non-Hodgkin lymphoma. European organization for research and treatment of cancer lymphoma cooperative group. *J Clin Oncol.* 1998; 16:41-7
105. Davis JE, Moss DJ. Treatment options for PTLD and other EBV-associated malignancies. *Tissue Antigens.* 2004; 63:285-92
106. Tosato G, Tanner J, Jones KD. Identification of interleukin-6 as an autocrine growth factor for EBV-immortalized B cells. *J Virol.* 1990; 64:3033-41
107. Scala G, Quinto I, Ruocco MR. Expression of an exogenous interleukin 6 gene in human EBV B cell confers growth advantage and in vivo tumorigenicity. *J Exp Med.* 1990; 172:61-8
108. Tanner J, Tosato G. Impairment of natural killer functions by interleukin 6 increases lymphoblastoid cell tumorigenicity in athymic mice. *J Clin Invest.* 1991; 88(1):239-47

109. Haddad E, Paczesny S, Leblond V. Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: a multicenter phase 1-2 clinical trial. *Blood*. 2001; 97:1590-7
110. Nepomuceno RR, Balatoni CE, Natkunam Y. Rapamycin inhibits the interleukin 10 signal transduction pathway and the growth of EBV B-cell lymphomas. *Pediatr Transplant*. 2004; 8(3):243-8
athymic mice. *J Clin Invest*. 1991; 88:239-47
111. Schuler W, Sedrani R, Cottens S. SDZ RAD, a new rapamycin derivative: pharmacological properties in vitro and in vivo. *Transplantation*. 1997; 64(1):36-42
112. Sherritt MA, Bharadway M, Burrows JM. Reconstitution of the latent T-lymphocyte response to Epstein-Barr virus is coincident with long-term recovery from post-transplant lymphoma after adoptive immunotherapy. *Transplantation* 2003; 75: 1556-60
113. Haque T, Wilkie GM, Taylor C. Treatment of EBV-positive PTLD with partly HLA-matched allogenic cytotoxic T cells. *Lancet*. 2002; 360(9331):436-42
114. Penn I, Porat G. Central nervous system lymphomas in organ allograft recipients. *Transplantation*. 1995; 59(2):240-4
115. **Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S.** The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol*. 1998; 51(7):506-11
116. **Banham AH, Connors JM, Brown PJ.** Expression of the FOXP1 transcription factor is strongly associated with inferior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(3):1065-72.
117. **Adida C, Haioun C, Gaulard P.** Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*. 2000; 96(5):1921-5
118. Zinzani PL, Dirnhofer S, Sabattini E. Identification of outcome predictors in diffuse large B-cell lymphoma. Immunohistochemical profiling of homogeneously treated de novo tumors with nodal presentation on tissue micro-arrays. *Haematologica*. 2005; 90(3):341-7
119. Nalesnik MA. Clinicopathologic characteristics of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Recent Results Cancer Res*. 2002; 159:9-18
120. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood*. 1997; 89(11):3909-18.
121. Armitage, J.O. and Weisenburger, D.D. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J. Clin. Oncol*. 1989; 16(8):2780-95
122. Rosenwald A, Staudt LM. Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2003; 44 Suppl 3:S41-7
123. Wright G, Tan B, Rosenwald A. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(17):9991-6
124. Hummel M, Bentinik S, Berger H. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006; 354(23):2419-30
125. Bea S, Zatl A, Wright G. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*. 2005; 106(9):3183-90
126. Tagawa H, Suguro M, Tsuzuki S. Comparison of genome profiles for identification of distinct

subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2005; 106(5):1770-7

127. Rosenwald A, Wright G, Chan WC. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002; 346(25):1937-47

128. Iqbal J, Neppalli VT, Wright G. BCL2 expression is a prognostic marker for the activated B-cell-like type of diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24(6):961-8

129. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004; 103(1):275-82

130. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg ML. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood* 2007; 109(11):4930-5

131. Novoa-Takara L, Perkins SL, Qi D. Histogenetic phenotypes of B cells in posttransplant lymphoproliferative disorders by immunohistochemical analysis correlate with transplant type: solid organ vs hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 104-12

132. Vakiani E, Basso K, Klein U. Genetic and phenotypic analysis of B-cell post-transplant lymphoproliferative disorders provides insights into disease biology *Hematol Oncol* 2008

133. Lawrence R, Johnson LR, Nalesnik MA, Swerdlow SH. Impact of Epstein-Barr virus in monomorphic B-cell posttransplant lymphoproliferative disorders: a histogenetic study. *Am J Surg Pathol*. 2006; 30:1604-12.

134. Rezk SA, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Hum. Pathol*. 2007; 38:1293-304

135. Oyama T et al Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *Am J Surg Pathol*. 2003; 27(1):16-26

136. Chiles TC. Regulation and function of cyclin D2 in B lymphocyte subsets. *J Immunol*. 2004; 173(5):2901-7. Review

137. Teramoto N, Pokrovskaja K, Szekely L. Expression of cyclin D2 and D3 in lymphoid lesions. *Int J Cancer*. 1999; 81(4):543-50

138. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC. Expression of PKC-beta or cyclin D2 predicts for inferior survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2005; 18(10):1377-84. Kamimura K, Hojo H, Abe M. Characterization of expression of protein kinase C isozymes in human B-cell lymphoma: Relationship between its expression and prognosis. *Pathol Int*. 2004; 54(4):224-30

140. Filipits M, Jaeger U, Pohl G. Cyclin D3 is a predictive and prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(3):729-33
141. Sanchez –Beato M, Camacho FI, Martínez-Montero JC. Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclin D3 overexpression. p27/KIP1-cyclin D3 colocalization in tumor cells. *Blood.* 1999; 94(2):765-72
142. Sanchez –Beato M, Martínez-Montero JC, Sáez AI. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 in lymphoid tissue: p27KIP1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol.* 1997; 151(1):151-60
143. Adida C, Haioun C, Gaulard P. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2000; 96(5):1921-5
144. Watanuki-Miyauchi, Kojima Y, Tsurumi H. Expression of survivin and of antigen detected by a novel monoclonal antibody, T332, is associated with outcome of diffuse large B-cell lymphoma and its subtypes. *Pathol Int.* 2005;55(6):324-30
145. Wlodarska I, Veyt E, De Paep P. FOXP1, a gene highly expressed in a subset of diffuse large B-cell lymphoma, is recurrently targeted by genomic aberrations. *Leukemia.* 2005; (8):1299-305
- 146. Barrans SL, Fenton JA, Banham A.** Strong expression of FOXP1 identifies a distinct subset of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients with poor outcome. *Blood.* 2004; **104(9):2933-5**