

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Ematologia clinica, sperimentale ed ematopatologia

Ciclo XXIV°

Settore Concorsuale di afferenza: 06/A4

Settore Scientifico disciplinare: MED15/MED08

TITOLO TESI

LA MOLECOLA IRTA1 (IMMUNOGLOBULIN SUPERFAMILY RECEPTOR TRANS LOCATION ASSOCIATED 1) RISULTA SELETTIVAMENTE ESPRESSA NEI LINFOMI NON HODGKIN B DELLA ZONA MARGINALE.

Presentata da: Dr Carlo Albero Sagramoso Sacchetti

Coordinatore Dottorato

Relatore

Ch.mo Prof Stefano A Pileri

Ch.mo Prof Stefano Pileri

SOMMARIO

Riassunto.....	Pag 2
Introduzione.....	pag 3
Linfomi della zona marginale.....	pag 3
IRTA1.....	pag 6
Materiali e metodi.....	pag 9
Risultati.....	pag 12
Discussione.....	pag 18
Figure e tabella.....	pag 25
Bibliografia.....	pag 32

RIASSUNTO

Introduzione. La diagnosi di linfoma non Hodgkin B della zona marginale si basa su criteri morfologici e sulla sostanziale negatività per marcatori immunoistochimici espressi in altri sottotipi di linfoma B. L'obiettivo di questo lavoro è stato, quindi, quello di ricercare una molecola specifica associata ai linfomi della zona marginale.

Materiali e Metodi. Sono stati esaminati 2.104 linfomi periferici di entità nosologia eterogenea mediante un anticorpo monoclonale, diretto contro la molecola IRTA1, che riconosce la zona marginale nei tessuti linfoidei umani.

Risultati. Si è riscontrata espressione di IRTA1 nel 93% dei linfomi della zona marginale ad insorgenza extranodale e nel 74% di quelli primitivi linfonodali suggerendo la possibilità che questi linfomi possano originare dalle cellule perifollicolari o monocitoidi IRTA1+ riscontrabili nei linfonodi reattivi. La valutazione immunoistochimica mediante doppia colorazione (IRTA1/bcl6), ha inoltre dimostrato come vi sia una modulazione fenotipica nelle cellule marginali neoplastiche nel momento in cui esse colonizzano i follicoli linfoidei e durante la loro circolazione nei centri germinativi. Le cellule marginali neoplastiche che differenziano in senso plasmacellulare perdono l'espressione di IRTA1

Discussione. In conclusione, tali evidenze hanno permesso di ampliare la conoscenza sulla biologia dei linfomi marginali e sottolineano come IRTA1 sia il primo marcatore diagnostico positivo per queste neoplasie.

INTRODUZIONE

LINFOMI DELLA ZONA MARGINALE

I linfomi della zona marginale sono un gruppo eterogeneo di neoplasie di derivazione dai linfociti B periferici le quali, secondo i criteri stabiliti dall'organizzazione mondiale della sanità riguardo i tumori dei tessuti emopoietici e linfoidi, vengono suddivisi in tre principali categorie; il linfoma marginale primitivo nodale, la forma ad insorgenza splenica ed il linfoma marginale derivante dal tessuto linfatico associato alle mucose (cd MALT).

Linfoma Marginale Nodale

I linfomi marginali primitivi nodali rappresentano l' 1,5-1,8% delle neoplasie linfoidi; l'età media di insorgenza è di circa 60 anni (ma possono insorgere anche nei bambini), non vi è predilezione di sesso e possono associarsi ad infezione da epatite C.

Usualmente la presentazione clinica è data da adenopatie localizzate o generalizzate asintomatiche in assenza di documentata localizzazione nodale da parte di un linfoma MALT eventuale, quest' ultima, che può occorrere in circa 1/3 dei casi soprattutto in pazienti affetti da tiroidite di Hashimoto o da sindrome di Sjogren.

Sotto il profilo morfologico il linfoma marginale nodale può presentare architettura nodulare, con elementi neoplastici che circondano follicoli reattivi, o si caratterizza per un pattern di crescita interfollicolare. Vi sono, tuttavia, casi in

l'organizzazione della componente neoplastica appare diffusa per colonizzazione dei follicoli la cui normale componente centroblastica-centrocitica appare morfologicamente poco evidente.

La cellularità risulta costituita da elementi di piccole dimensioni con nucleo inciso ed ampio citoplasma chiaro (elementi monocitoidi) ai quali si associano sparse grandi cellule trasformate e plasmacellule mature. Queste ultime, possono essere quantitativamente eterogenee, da sparse a prevalenti conferendo un grado variabile di differenziazione in senso plasmacellulare .

Linfoma della Zona Marginale ad insorgenza extranodale tipo MALT.

Rappresentano il 7-8% dei linfomi B ed oltre il 50% dei linfomi primitivi gastrici. L'età media di insorgenza è attorno a 60 anni con lieve predilezione per il sesso femminile. Molti casi di linfoma MALT insorgono in pazienti con storia di disturbi infiammatori cronici ad esempio infezioni croniche, processi autoimmuni, i quali determinano accumulo di tessuto linfoide organizzato (cosiddetto tessuto MALT acquisito) il quale forma il substrato sul quale può insorgere il linfoma.

Esempi di microorganismi che possono determinare accumulo di tessuto linfoide sono l' *Helicobacter pylori* a livello gastrico, la *Chlamydia psittaci* negli annessi oculari e la *Borrelia burgdorferi* in sede cutanea. Il linfoma MALT insorge prevalentemente nel tratto gastroenterico con predilezione dello stomaco; altre sedi sono le ghiandole salivari, il polmone, la regione testa-collo, gli annessi oculari e la cute. La maggior parte dei pazienti si presenta in stadio I/II mentre una bassa percentuale mostra localizzazione osteomidollare (2-20%); la maggior frequenza di coinvolgimento midollare si osserva nei linfomi che originano nel

polmone e negli annessi oculari. Possono esservi multiple localizzazioni sincrone extranodali mentre più raro risulta il coinvolgimento nodale plurifocale.

Morfologicamente gli elementi neoplastici presentano carattere infiltrativo attorno a follicoli secondari preservati formando ampi aggregati. Le cellule sono di piccole e medie dimensioni con nucleo lievemente irregolare a cromatina moderatamente dispersa, nucleoli incospicui ed ampio citoplasma chiaro. Aspetti differenziativi in senso plasmacellulare sono presenti in circa 1/3 dei linfomi MALT gastrici, è frequente nella cute ed è una caratteristica quasi costante nei linfomi a sede tiroidea. In alcuni casi si possono associare sparse cellule di grandi dimensioni a fisionomia simil centroblastica-immunoblastica. Nei tessuti a rivestimento ghiandolare, si osserva aggressione dell'epitelio da parte della popolazione neoplastica (c.d. lesioni linfo-epiteliali) il quale appare distorto o sostituito e spesso si osserva colonizzazione neoplastica dei centri germinativi.

Nel linfonodo il linfoma MALT invade la zona marginale con conseguente espansione delle aree interfollicolari; si possono associare aggregati di elementi B monocitoidi in sede parafollicolare e perisinusoidale e può osservarsi colonizzazione dei follicoli; citologicamente la cellularità risulta eterogenea e possono osservarsi aspetti di differenziazione in senso plasmacellulare.

Linfoma della Zona Marginale Splenica.

È un disordine linfoproliferativo relativamente raro (2% circa delle neoplasie linfoidi), l'età media di insorgenza è attorno a 50 anni e non vi è predilezione di sesso. Sotto l'aspetto clinico si osserva splenomegalia talora accompagnata da piastrinopenia autoimmune o anemia e variabile presenza di linfociti villosi nel sangue periferico. Il coinvolgimento midollare è frequente mentre linfadenopatie

ed infiltrazione nodale si osserva raramente. Circa 1/3 dei pazienti presentano una piccola componente monoclonale sierica ma marcata iperviscosità ematica ed ipergammaglobulinemia risultano rare. Nell' Europa del sud si è riscontrata associazione tra infezione da HCV e sviluppo del linfoma marginale splenico.

Morfologicamente la polpa bianca risulta costituita da una zona centrale di piccole cellule che circonda, o più frequentemente sostituisce i centri germinativi; si osserva marcata infiltrazione neoplastica della polpa rossa in sede intrasinusale. La cellularità è rappresentata da elementi di piccole dimensioni ma possono associarsi grandi cellule a fisionomia blastica ed istiociti epitelioidi nel contesto degli aggregati neoplastici.

.

IRTA1

IRTA1 (immunoglobulin superfamily receptor translocation associated 1)² appartiene ad una famiglia di 5 geni (IRTA1-IRTA5) posti sul cromosoma 1q21. Anomalie cromosomiche a livello di 1q21-23 sono di riscontro relativamente frequente nei linfomi non Hodgkin B e nel mieloma multiplo. Tra i diversi sottotipi di linfoma non Hodgkin, traslocazioni cromosomiche a carico della regione 1q21-23 sono state riportate nel 17% dei linfomi centro follicolari, nel 20% delle forme diffuse a grandi cellule, nel 39% dei linfomi della zona marginale e in percentuale variabile da 27% a 38% nei linfomi di Burkitt. Analisi di ibridazione genomica comparativa (CGH) hanno evidenziato come il cromosoma 1q21-23 sia un sito ad elevata amplificazione nel 10% dei linfomi diffusi a grandi cellule. L' elevata frequenza di anomalie strutturali del cromosoma 1q21 osservate nei linfomi B, pertanto, porta a supporre che questo locus genetico possa avere un ruolo nella patogenesi di queste malattie².

Dal punto di vista strutturale le molecole della famiglia IRTA appartengono alla superfamiglia delle immunoglobuline. Vengono definite molecole appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline proteine recettoriali comprendenti, nella loro struttura uno o più domini immunoglobulinici. Il dominio immunoglobulinico e' una sequenza ripiegata di circa 100 amminoacidi i cui estremi risultano stabilizzati da un ponte disolfuro; la struttura di tale dominio risulta costituita da due foglietti beta ciascuno, dei quali formato da tre o cinque filamenti beta di circa 5-10 amminoacidi ad andamento antiparallelo. I domini immunoglobulinici vengono distinti, in domini IgV (cinque nastri beta), IgC (tre nastri beta) a

seconda del grado di omologia alla regione variabile o costante degli anticorpi; esiste un terzo tipo di dominio (C2 o H) (tre nastri beta) il quale presenta omologia strutturale sia con le regioni C che con quelle V delle immunoglobuline. La superfamiglia dei recettori delle immunoglobuline risulta costituita da centinaia di molecole le quali giocano un ruolo centrale nella trasmissione del segnale durante la risposta immunitaria ma risultano anche coinvolte in numerosi processi non immunologici³. IRTA1, molecola appartenente al sottotipo IgC (FcRH)^{4,5} della superfamiglia delle immunoglobuline, è una proteina del peso di 55,7 Kd e della lunghezza di 515 amminoacidi caratterizzata da quattro domini extracellulari omologhi ai recettori della frazione costante delle immunoglobuline con tre siti di glicosilazione, un dominio trans membrana ed una porzione citoplasmatica.

La porzione trans membrana presenta capacità di modulare in senso positivo o negativo la trasduzione del segnale mediante fosforilazione di residui tirosinici della proteina; ciò comporta sia la formazione di siti di attacco per altre molecole implicate nell' amplificazione del segnale di attivazione cellulare (motivi ITAM), sia la formazione di siti di attacco per molecole ad attività tirosin fosfatase con conseguente attività inibitoria nei confronti di differenti molecole coinvolte nella trasduzione del segnale (motivi ITIM). Dal momento che tali motivi sono implicati nella trasduzione del segnale nell' ambito della risposta immunitaria umorale, nella comunicazione intercellulare e nella migrazione cellulare si pensa che IRTA1 possa avere un ruolo in tali processi.⁴⁻⁸ .

I geni della famiglia IRTA sono espressi in zone topograficamente distinte delle aree B dipendenti.

IRTA2 ed IRTA3 si rilevano nella zona chiara del centro germinativo, nei linfociti B intraepiteliali ed in quelli interfollicolari; è presente debole espressione nella zona mantellare la quale presenta espressione di IRTA4 ed IRTA5.

IRTA1 è espresso al di fuori dei follicoli, nelle aree marginali, nei linfociti B intraepiteliali ed in una popolazione B memoria (elementi B monocitoidi) che si riscontra nei linfonodi in corso di alcuni processi infettivi (ad esempio nella linfadenite da *Toxoplasma* o in corso di infezione da HIV), mentre non si osserva espressione della molecola nella zona marginale splenica.^{5-,9}

MATERIALI E METODI

Selezione casi.

In questo lavoro sono stati testati 2.104 campioni fissati in formalina di linfomi di derivazione dai linfociti B periferici conservati presso l'archivio dell'istituto di Emolinfopatia dell'Università di Bologna rappresentativi della maggior parte delle entità nosologiche riportate nella più recente classificazione curata dall'organizzazione mondiale della sanità sulle neoplasie degli organi linfoidei e dei tessuti emopoietici. (Tab. 1). E' stata effettuata valutazione immunohistochimica su sezioni complete, mediante utilizzo di un anticorpo monoclonale di topo anti IRTA1 sviluppato presso l'istituto di Ematologia dell'Università di Perugia, il quale riconosce una proteina del peso molecolare di 70-75 Kd. Tale anticorpo risulta espresso negli elementi marginali sub epiteliali del tessuto linfoide associato alle mucose e degli elementi B monocitoidi⁹. I campioni sono stati consensualmente valutati con singola o doppia colorazione mediante anticorpi diretti contro i seguenti antigeni: CD20, CD79a, CD3, CD5, CD21, BCL2, IgD, MIB-1 (Dako A/S Glostrup, Denmark), CD23 (Menarini Diagnostics, Workingham, UK), BCL1/ciclina D1 (Thermo Scientific, Freemont, CA, USA), PAX5, (Transduction Laboratories, San Diego, CA, USA), CD138 (Serotec, Kidlington, UK), MUM1/IRF4 (anti multiple myeloma oncogene 1/Interferon Regulatory Factor 4) e BCL6 (sviluppati presso l'istituto di Ematologia dell'università di Perugia)^{14, 15}.

Immunoistochimica.

Dagli inclusi in paraffina sono state tagliate sezioni dello spessore di 3-5 μm le quali sono state sottoposte a smascheramento antigenico mediante tre cicli di 5 minuti ciascuno a 750W in 1 mM di tampone EDTA a pH8¹⁷. La maggior parte delle sezioni sono state sviluppate mediante fosfatasi immunoalcalina (APAAP)¹⁸ mentre una quota minore mediante perossidasi (En Vision, Dako A/S, Glostrup Denmark) seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Sono stati considerati positivi i casi nei quali almeno il 30% della popolazione neoplastica presentava espressione dell' antigene¹⁶.

E' stata effettuata doppia colorazione per IRTA1 e BCL6 mediante una procedura sequenziale. Si è dapprima provveduto a smascheramento antigenico ponendo le sezioni paraffinate in tampone tris(idrossimetil)amino metano/EDTA e riscaldandole in pentola a pressione all' interno di un forms a microonde per 3 minuti a 900W dal raggiungimento della pressione. E' stato quindi applicato l' anticorpo anti BCL6 sviluppato mediante tecnica EnVision e successivamente la molecola anti IRTA1 rivelata con procedura APAAP¹⁸. I vetrini, infine, sono stati contrastati per 20 secondi in ematossilina di Gill e montati con gelatina glicerolata.

Ibridazione in Situ a Fluorescenza.

Due casi selezionati sono stati investigati mediante ibridazione in situ a fluorescenza con sonda BCL2 break apart per la valutazione della traslocazione t(8;14) (Vysis LSI, Abbott, Abbot Park, IL USA) e con sonde centromeriche per

trisomia dei cromosomi 3 e 18 (CEP3-D3Z1, cep18-D18Z1, Abbott, Abbott Park, IL USA) utilizzando il protocollo segnalato nelle linee guida^{19,20}.

Il valore soglia diagnostico è stato calcolato come la media di cellule false positive più 3 deviazioni standard valutata su 20 campioni tissutali di linfonodi reattivi.

RISULTATI

Espressione di IRTA1 nei linfomi della zona marginale

Linfoma della zona marginale ad insorgenza extranodale.

Dal momento che IRTA1 risulta selettivamente espresso nel tessuto linfoide associato alle mucose innato ed acquisito e' stata valutata l' espressione della molecola in 329 linfomi della zona marginale ad insorgenza extranodale tipo MALT a livello cutaneo (69 casi), dei tessuti molli (14 casi), dei seni paranasali (1 caso), del rinofaringe (7 casi), del cavo orale (3 casi), della laringe (1 caso), del polmone (24 casi), della pleura (3 casi), delle ghiandole salivari maggiori (25 casi), dell' esofago (1 caso), dello stomaco (90 casi) del piccolo intestino (11 casi), del colon (7 casi), del retto (2 casi), del fegato (9 casi), della colecisti (1 caso), del rene (3 casi), della vescia urinaria (1 caso), dell' utero (5 casi) del timo (1 caso) e della tiroide. Si e' osservata espressione di IRTA1 in 307/329 casi (93%) con positività prevalentemente localizzata a livello di membrana con ed intensità variabile. Gli elementi neoplastici a maggior intensità di IRTA1 risultano quelli che presentano aspetti di aggressione nei confronti dell' epitelio formando lesioni linfo-epiteliali, mentre gli elementi a distanza presentano espressione debole o, talora, assente. Gli elementi IRTA1+ sono di piccole e medie dimensioni ed in alcuni casi tendono a formare lesioni linfo-epiteliali sottoforma di aggregati neoplastici (figura 1 A-F).

Linfoma della zona marginale ad insorgenza nodale.

In considerazione del fatto che IRTA1 risulta espresso in un sottogruppo di linfociti situati accanto alle cellule del mantello e negli elementi linfoidi B monocitoidi, entrambi ritenuti come possibili cellule dalla quali deriva il linfoma della zona marginale nodale e' stata valutata l' espressione di IRTA1 in 210 casi diagnostici per questa patologia, con un risultato positivo in 154/210 casi (73%). Come osservato nei linfomi marginali ad insorgenza extranodale, l' intensità di espressione della molecola e' risultata variabile da debole a forte. Inoltre, si e' riscontrata cross reattività con le cellule endoteliali e con le cellule sinusali costituendo, quindi, un controllo interno positivo nella valutazione dell' immunoreattività.

Le cellule IRTA1 positive frequentemente circondano i follicoli reattivi e si espandono nelle aree interfollicolari. Citologicamente tali cellule appaiono di piccole dimensioni, a nucleo clivato, di aspetto simil-centrocitico o di media taglia con citoplasma chiaro (aspetto monocitoide). Nel contesto della popolazione neoplastica si possono osservarsi alcuni elementi di grande taglia IRTA1 che coesprimono CD30 prevalentemente nelle aree interfollicolari. In alcuni casi di linfoma marginale a spiccata differenziazione plasmacellulare si osserva perdita di espressione di IRTA1 quando esse acquisiscono la morfologia ed il fenotipo della plasmacellula. La figura 2 mostra un caso nel quali follicoli reattivi risultano separati da espansione neoplastica delle aree interfollicolari che risultano otticamente chiare (A) le quali risultano IRTA1+ (B) con positività prevalentemente di membrana (C). Un' altro caso con caratteristiche architetturali analoghe (D) mostra come la cellularità neoplastica risulti costituita da elementi di piccole e medie con nucleo prevalentemente rotondeggiante a cromatina

relativamente densa ed ampio citoplasma chiaro (elementi monocitoidi) (E) i quali risultano IRTA1+ (F).

Inoltre, in casi nei quali si osserva marcata differenziazione in senso plasmacellulare, gli elementi neoplastici perdono l' espressione del recettore nel momento in cui acquisiscono la morfologica plasmocitica.

La figura 3 mostra un caso di linfoma marginale a differenziazione plasmacellulare (A) nel quale si evidenzia una popolazione neoplastica IRTA1+ con quota plasmacellulare IRTA1- (B) monotipica per la catena leggera kappa delle immunoglobuline (C, D).

Solo in 2/9 linfomi marginali nodali con pattern tipo splenico²¹ si e' osservata debole espressione di IRTA1 in una percentuale inferiore a 30% della popolazione neoplastica.

Linfoma della zona marginale ad insorgenza splenica.

Un quadro simile a quanto osservato nei linfomi marginali nodali con pattern tipo splenico si e' osservato in 5/21 linfomi della zona marginale primitivi splenici nei quali le cellule atipiche IRTA1+ (inferiori a 30%) risultano di medie dimensioni e presentano caratteristiche morfologiche sovrapponibili alle cellule linfoma tose IRTA1 negative e risultano localizzate nella polpa rossa attorno ai corpuscoli di Malpighi.

IRTA1 e colonizzazione follicolare nei linfomi della zona marginale.

I follicoli B reattivi sono una componente d' accompagnamento nel linfoma marginale sia nelle forme nodali che in quelle ad insorgenza extranodale e frequentemente risultano sostituiti (parzialmente o completamente) da parte delle cellule neoplastiche definendo il pattern di crescita noto come colonizzazione dei follicoli¹⁹.

Dal momento che IRTA1 risulta selettivamente espresso dalle cellule del linfoma marginale e' stata condotta una valutazione immunoistochimica di tale molecola in associazione ad altri marcatori quali CD10, BCL6, IRF4 e le catene immunoglobuliniche al fine di studiare l' interazione delle cellule neoplastiche con gli elementi del follicolo reattivo. Si sono riscontrati tre principali pattern di crescita nel linfoma marginale nodale.

Il primo risulta caratterizzato da follicoli B i quali contengono elementi CD10+, BCL6+, IRTA1-, con regolare struttura dei reticoli di cellule follicolari dendritiche CD21+, circondati da elementi IRTA1+, configurando la variante senza colonizzazione dei follicoli (o con follicoli minimamente colonizzati) del linfoma marginale nodale (figura 4A).

Un secondo pattern di crescita evidenzia follicoli reattivi colonizzati da una percentuale variabile (da moderata ad elevata) di elementi IRTa1+ (figura 4B); in tali casi nel contesto dei follicoli si evidenzia una ricca componente linfoide BCL6+ quantitativamente maggiore rispetto alle cellule CD10+ (figura 4B e 4C); tali elementi non presentano le caratteristiche morfologiche proprie delle cellule centroblastiche-centrocitiche, bensì appaiono molto simili agli elementi monocitoidi IRTA1+ che si rinvencono nelle aree interfollicolari. La doppia

colorazione immunohistochimica effettuata su due casi di linfoma marginale con colonizzazione dei follicoli evidenzia, infatti, parziale coespressione di BCL6 ed IRTA1 all' interno dei follicoli (figura 4E). A differenza di quanto evidenziato nel primo pattern di crescita in questi casi si osserva destrutturazione dei reticoli di cellule follicolari dendritiche CD21+ nel contesto dei follicoli colonizzati (figura 4D). Quanto osservato fa supporre che gli elementi neoplastici che colonizzano i follicoli presentino progressiva perdita di espressione di IRTA1 e parziale acquisizione del fenotipo proprio della cellula del centro germinativo con espressione di BCL6 ma non di CD10 (figura 4F). Ad ulteriore dimostrazione di quanto descritto i due casi studiati mediante doppia colorazione immunohistochimica sono stati sottoposti a ricerca della traslocazione t(14;18) e della presenza di trisomie del cromosoma 3 con risultato negativo confermando la diagnosi di linfoma della zona marginale nodale.

Il terzo pattern osservato appare rappresentato da cellule neoplastiche IRTA1+ che circondano follicoli B costituiti prevalentemente da elementi IRTA1- i quali presentano differenziazione plasmacellulare con restrizione per una delle catene leggere delle immunoglobuline (figura 5) e corrisponde alla colonizzazione dei follicoli tipo III descritta da Isaacson e Norton¹⁰. Anche in tali casi si osserva marcata destrutturazione dei reticoli di cellule follicolari dendritiche CD21+.

Espressione di IRTA1 in linfomi B periferici non marginali.

Per dimostrare l'effettiva selettività di espressione di IRTA1 nei linfomi della zona marginale (ad eccezione della forma ad insorgenza splenica primitiva) sono stati studiati 1.514 linfomi di derivazione dai linfociti B periferici non marginali i quali, con poche eccezioni, sono risultati negativi (Tab 1).

2/325 casi di CLL/linfoma a piccoli linfociti, 4/121 casi di linfoma a cellule del mantello e 43/320 casi di linfoma centro follicolare (prevalentemente di grado IIIB) hanno mostrato parziale espressione di IRTA1 ma sempre quantitativamente inferiore al valore soglia definito del 30%.

Nei primi due tumori le cellule IRTA1 positive corrispondono ad elementi linfomatosi che infiltrano la zona marginale dei follicoli residui, mentre nei linfomi centro follicolari si osserva una piccola rima di cellule IRTA1+ attorno ai follicoli neoplastici reminiscenti di una minima differenziazione in senso marginale del clone linfomatoso.

69/256 casi di linfoma B diffuso a grandi cellule (27%) presentano espressione di IRTA1 senza significativa differenza tra le forme ad insorgenza nodale e quelle extranodali.

I casi IRTA1+ di linfoma diffuso a grandi cellule presentano un pattern di crescita interfollicolare simile a quanto osservato nei linfoma marginali nodali ed extranodali ed inoltre, in questi casi si osserva parziale espressione di CD30 analogamente a quanto descritto nelle sparse grandi cellule nel contesto della componente indolente del linfoma marginale (figura 6).

DISCUSSIONE

In questo lavoro condotto su 2,104 casi linfoma di derivazione dai linfociti periferici si è dimostrato come, nell'ambito dei linfomi a piccole cellule, l'espressione del recettore IRTA1 risulti sostanzialmente ristretta nei linfomi della zona marginale nodale ed extranodale mentre i linfomi marginali ad insorgenza splenica risultano sostanzialmente IRTA1 negativi.

Queste osservazioni implicano diverse considerazioni nell'ambito della diagnostica e della biologia di queste entità nosologiche.

L'elevata frequenza di espressione di IRTA1 nei linfomi della zona marginale ad insorgenza extranodale risulta in accordo con l'osservazione che questa molecola risulta espressa nel tessuto linfoide associato alle mucose⁹, che si reputa essere la controparte normale di questo tipo di linfoma. Ciò fornisce una validazione dell'ipotesi formulata da Isaacson nel 1983 riguardo la correlazione tra il tessuto linfoide associato alle mucose ed il linfoma B a basso grado del tratto gastrointestinale²³ concetto successivamente esteso anche a linfomi di basso grado che insorgono altri organi²⁴ anche in siti anatomici inusuali quali il rene²⁵, il timo^{26, 27} o la colecisti²⁸.

E' interessante notare, inoltre, come le cellule neoplastiche IRTA1+ presentino le medesime caratteristiche topografiche del tessuto linfoide associato alle mucose, ovvero marcata tendenza al tropismo epiteliale in tutti gli organi studiati (foveole gastriche, corpuscoli di Hassal nel timo, ecc).

La ragione per la quale l'intensità di espressione per IRTA1 risulti nettamente maggiore negli elementi neoplastici posti in prossimità degli epiteli rispetto a

quelli a distanza non è al momento nota. Una possibile spiegazione speculativa potrebbe essere che l' espressione di IRTA1 rappresenti un marcatore di zona piuttosto che di linea cellulare e che le cellule neoplastiche acquisiscano la molecola una volta che entrano nella zona marginale. Questa ipotesi risulta in qualche maniera supportata dalla focale espressione di IRTA1 osservata in alcuni casi di linfoma linfocitico, linfoma a cellule del mantello e linfoma centro follicolare che potrebbe riflettere una tendenza differenziativa in senso marginale di questi linfomi sia dal punto di vista topografico, che morfologico. In questo lavoro si è riscontrata espressione di IRTA1 nel 73% dei linfomi della zona marginale nodale.

Questa evidenza suggerisce una possibile relazione tra questa entità linfomatosa e la sottile rima di cellule IRTA1 localizzata alla periferia dei mantelli nei linfonodi reattivi⁹, che rappresenta una distribuzione reminiscente della zona marginale²⁹; inoltre, almeno una parte dei linfomi marginali nodali IRTA1 positivi, presenta una morfologia monocitoide il che risulta in accordo con l' osservazione che gli elementi monocitoidi non neoplastici osservati in casi di linfadeniti reattive esprime tale molecola⁹.

L' espressione di IRTA1 sia nelle cellule della zona marginale che negli elementi monocitoidi porta a supporre che tali sottopopolazioni cellulari possano essere tra loro correlate anche se la questione rimane ancora materia di controversia^{30, 31}; tuttavia, l' inclusione del linfoma di derivazione dai linfociti B monocitoidi³² nella categoria del linfoma della zona marginale da parte della classificazione dell' OMS dei tumori linfoidei e degli organi ematopoietici²¹ e l' osservazione che entrambe queste forme linfomatose esprimano IRTA1 parrebbe corroborare tale ipotesi.

Inoltre, altre caratteristiche morfologiche del linfoma marginale nodale ed extranodale possono essere meglio comprese alla luce del pattern di espressione di IRTA1.

Ad esempio, l'evidenza che, nel momento in cui le cellule di questo tipo di linfoma assumono prominente aspetto differenziativo in senso plasmacellulare, perdono l'espressione di questa molecola, è consistente con l'osservazione che le plasmacellule sub-epiteliali presenti nelle tonsille reattive risultino IRTA1 negative ed è in accordo con l'ipotesi che esse siano il prodotto terminale differenziativo degli elementi B intraepiteliali³³⁻³⁵.

La valutazione immunohistochimica per IRTA1, inoltre, risulta utile nel chiarire le interazioni tra le cellule tumorali ed i follicoli reattivi sia nelle forme nodali che in quelle extranodali di linfoma marginale; in particolare, il fenotipo delle cellule neoplastiche che colonizzano il follicolo, può riflettere la capacità di questi elementi di ricircolare attraverso il centro germinativo attraverso l'acquisizione di BCL6 e conseguentemente essere oggetto di multipli eventi di ricombinazione somatica delle immunoglobuline.

Tale ipotesi appare supportata da precedenti lavori i quali hanno documentato come gli elementi B monocitoidi IRTA1 presenti nelle diverse aree di linfonodi reattivi presentino un carico maggiore di permutazioni somatiche.

Un precedente lavoro di analisi molecolare ha infatti dimostrato come gli elementi B monocitoidi IRTA1 positivi presenti in linfonodi reattivi (principalmente posti nei seni sub capsulari, nei seni intermedi e in minor quota nel contesto dei centri germinativi) risultano clonalmente correlati e che quelli presenti nel contesto dei centri germinativi presentano un maggior carico mutazionale delle immunoglobuline e coesprimano CD27, marcatore delle cellule B memoria³⁶.

Una piccola percentuale di linfomi della zona marginale splenica (5 casi su 21) presentano una modesta quota di elementi neoplastici IRTA1 positivi la quale, tuttavia, non raggiunge il valore soglia diagnostico del 30%.

Questa osservazione risulta in accordo con il dato che il parenchima splenico normale presenta rare cellule IRTA1 in corrispondenza della zona marginale della polpa bianca e ciò, rafforza l' ipotesi che la zona marginale splenica presenti caratteristiche biologiche differenti rispetto alla zona marginale presente in altri tessuti linfoidi.

E' infatti interessante, il dato che nei linfomi della zona marginale nodale con pattern di crescita tipo splenico solo una piccola quota di elementi neoplastici esprima IRTA1²¹ rispetto alle forme con pattern di crescita follicolare o con colonizzazione dei centri germinativi suggerendo la possibilità che quel tipo di linfoma sia maggiormente correlato alla forma primitiva splenica.

Sebbene l' espressione di IRTA1 risulti prevalentemente ristretta ai linfomi della zona marginale, nodale ed extranodale, alcuni casi di linfoma centro follicolare con aspetti differenziativi in senso marginale presentano positività per la molecola ai bordi dei follicoli neoplastici così come si osserva in occasionali elementi che invadono la zona marginale in casi di linfoma linfocitico e linfoma a cellule del mantello.

Tali osservazioni pongono la problematica di una possibile interazione tra le cellule neoplastiche ed il microambiente (zona marginale) che funga da evento scatenante per l' acquisizione del recettore. E che quindi, la diagnosi di linfoma della zona marginale deve essere basata sull' espressione immunofenotipica di IRTA1 in assenza di altri marcatori specifici per i diversi tipi di linfoma.

L' espressione di IRTA1 in una parte dei linfomi B diffuso a grandi cellule studiate rappresenta un ulteriore campo d' interesse.

Il pattern di distribuzione ed il profilo fenotipico delle cellule neoplastiche IRTA1 in questi linfomi, risulta simile a quello osservato nei linfoma della zona marginale nodale tuttavia, rimane una questione aperta se questi casi rappresentino una trasformazione di un pregresso linfoma marginale o una forma aggressiva de novo derivante dagli elementi monocitoidi-marginali.

Quanto descritto presenta un importante impatto diagnostico.

La diagnosi di linfoma della zona marginale viene posta sulla base del quadro clinico, delle caratteristiche morfologiche (specialmente l' evidenza di lesioni linfo-epiteliali) e del profilo fenotipico¹⁰.

La dimostrazione dell' espressione di IRTA1 può infatti risultare determinante nel caso che il prelievo biotico risulti di piccole dimensioni come nel caso di adenopatie profonde le quali spesso vengono prelevate con ago biopsia o nel caso in cui il materiale presenti artefatti da traumatismo che ne precludono la valutazione istomorfologica.

La dimostrazione dell' espressione di IRTA1 risulta inoltre d'ausilio nella distinzione tra un linfoma della zona marginale a spiccata differenziazione plasmacellulare ed un plasmocitoma extramidollare.

La classificazione dell' organizzazione mondiale della sanità sui tumori dei tessuti linfoidei e degli organi ematopoietici definisce il linfoma della zona marginale nodale come un "linfoma B primitivo nodale il quale morfologicamente ricorda un linfonodo coinvolto da un linfoma marginale extranodale o splenico in assenza di malattia extranodale".

In assenza di marcatori specifici per la zona marginale la distinzione tra un linfoma marginale ed altri tipi di linfoma a piccoli linfociti si basa su un insieme di caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche (negatività di marcatori specifici quali CD5, CD23, CD10, BCL6 e Ciclina D1)²¹.

IRTA1, quindi, rappresenta il primo marcatore diagnostico per le cellule della zona marginale extra spleniche risultando utile nella diagnostica differenziale tra il linfoma marginale e, il linfoma linfo-plasmocitico il linfoma a piccoli linfociti e le forme centro follicolari; ciò risulta importante soprattutto nei linfomi a crescita diffusa o parafollicolare in assenza di espressione di CD10 e BCL2.

La valutazione di IRTA1 non permette, tuttavia, di discriminare tra un linfoma marginale ed iperplasia della zona marginale sia nodale che extranodale⁴⁰.

In conclusione, si identifica IRTA1 come primo marcatore significativamente associato con i linfomi della zona marginale nodale ed extranodale; ciò amplia la conoscenza sulla biologia di queste patologie, ne permette un più corretto inquadramento diagnostico e può rappresentare un contributo per classificare con maggior precisione queste neoplasie.

Tabella 1

Neoplasie linfoidi	n	IRTA1 Casi positivi	%
Leucemia linfatica cronica/linfoma linfocitico*	325	0 ^s	0
Linfoma linfo-plasmocitico	30	0	0
Linfoma della zona marginale			
<i>Splenico</i>	21	0 ^s	0
<i>Nodale</i>	210	154	73
<i>Extranodale</i>	329	307	93
<i>Non ulteriormente classificabile</i>	30	22	73
Linfoma centro follicolare			
<i>G1/2</i>	130	0 ^s	0
<i>G 3°</i>	89	0 ^s	0
<i>G 3B</i>	21	0 ^s	0
<i>Non gradabile</i>	80	0 ^s	0
Linfoma a cellule del mantello	121	0 ^s	0
Leucemia a tricoleucociti	30	0	0
Linfoma B diffuso a grandi cellule	256	69	27
Linfoma di Burkitt	71	0	0
Plasmocitoma extramidollare	6	0	0
Linfoma di Hodgkin tipo classico.	91	0	0
Linfoma di Hodgkin a predominanza linfocitaria nodulare ^o	6	0	0
Linfoma di derivazione dai linfociti T periferici non ulteriormente classificabile*	160	0	0
Linfoma T angioimmunoblastico	48	0	0
Linfoma anaplastico a grandi cellule ALK ⁺	27	0	0
Linfoma anaplastico a grandi cellule ALK ⁻	17	0	0
Linfoma T enteropatico ^a	1	0	0
Micosi fungoide	5	0	0

2/325 casi di leucemia linfatica cronica, 5/21 casi di linfoma marginale splenico , 4/121 casi di linfoma a cellule del mantello, e 9/130 casi di linfoma centro follicolare G1/2, 15/89 G3A, 8/21 G3B, e 11/80 NAS contengono una quota di elementi IRTA1⁺ inferiori al 30% degli elementi neoplastici 30%.

Figura 1

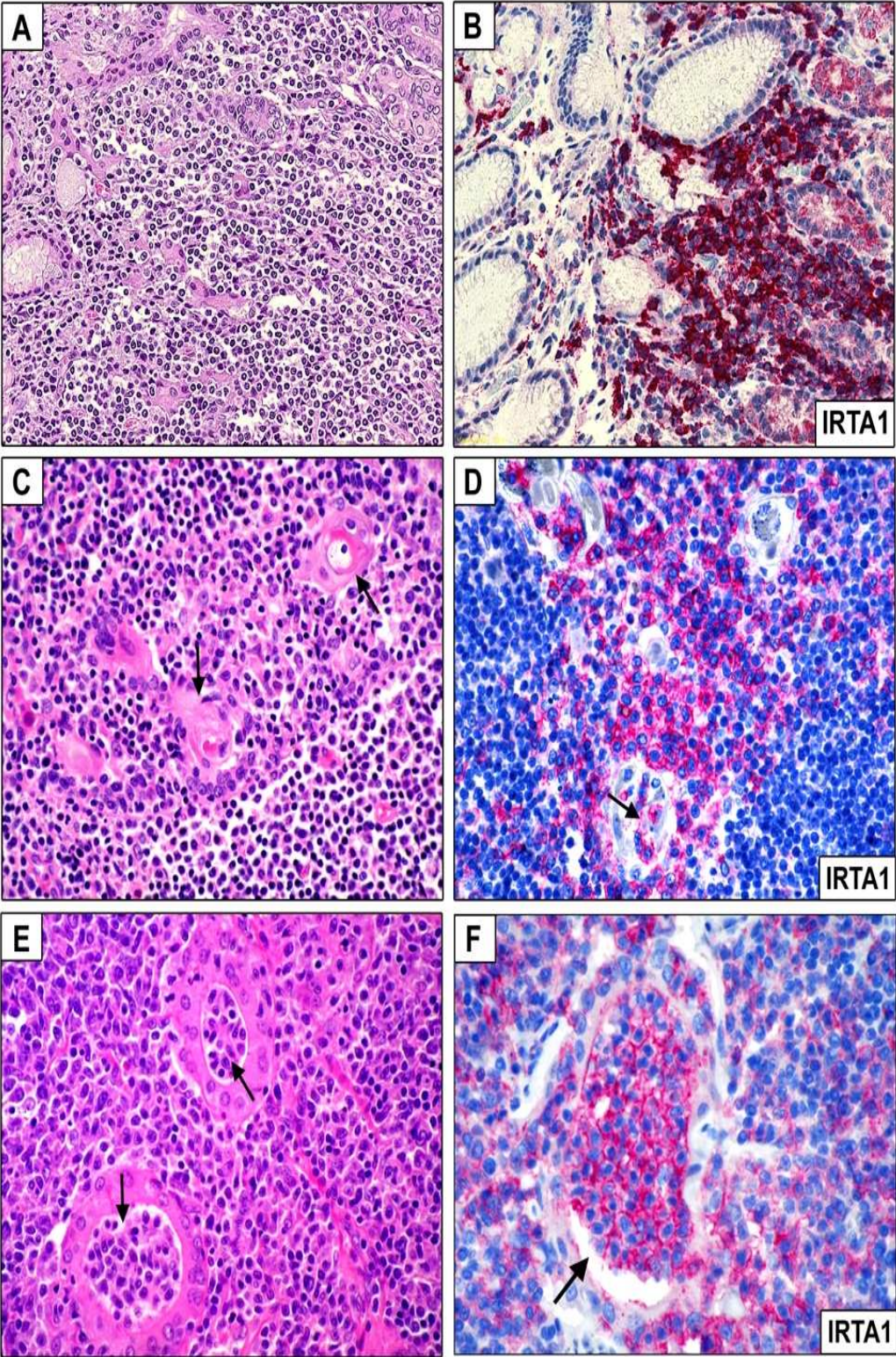


Figura 2

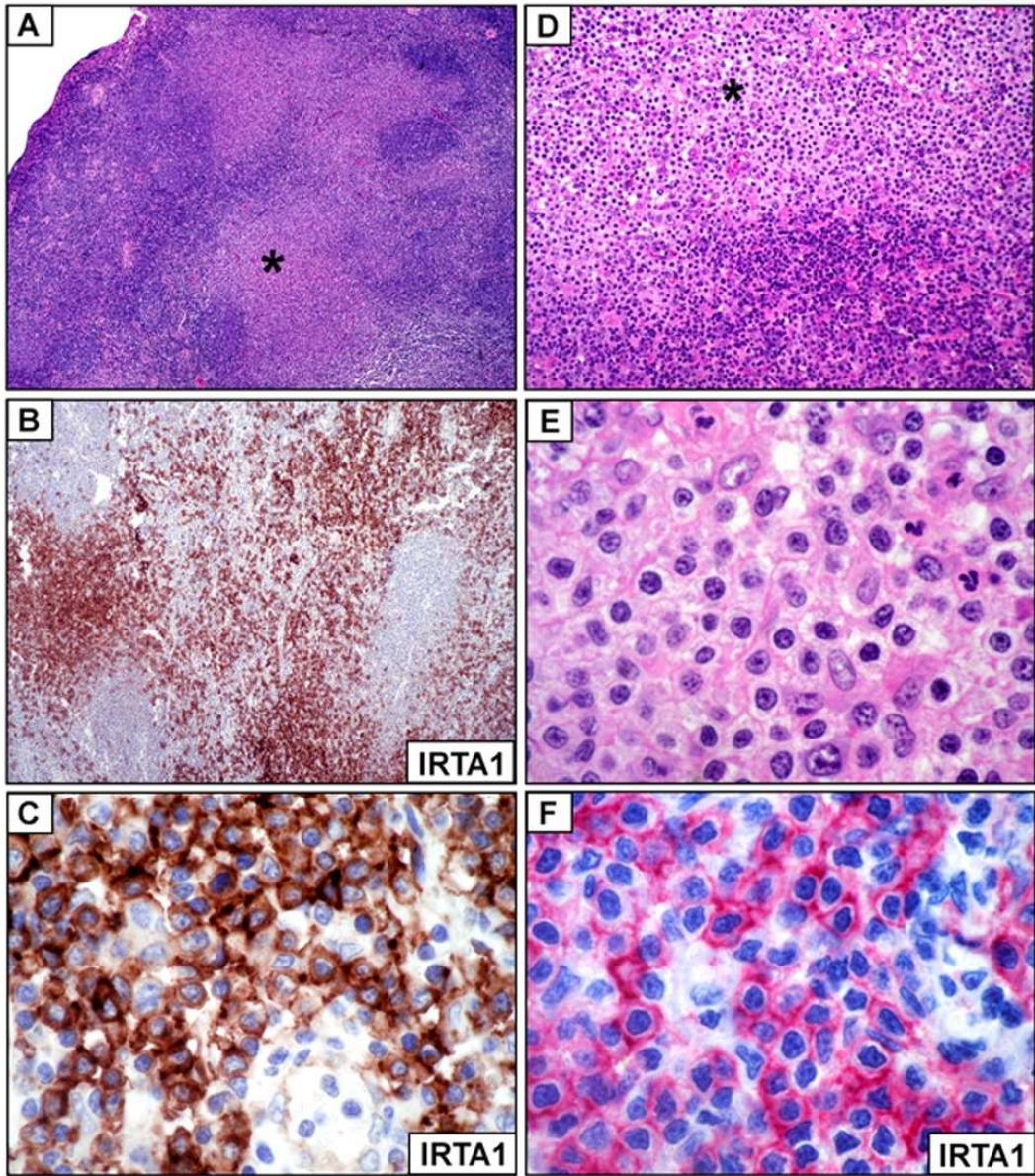


Figura 3

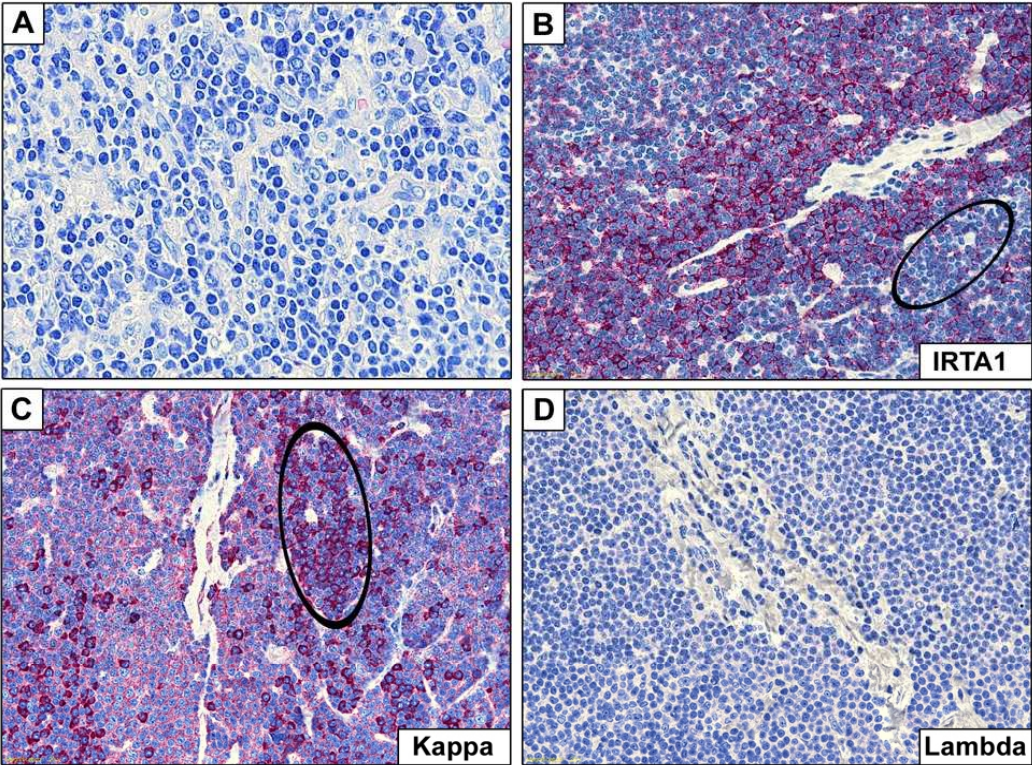


Figura 4

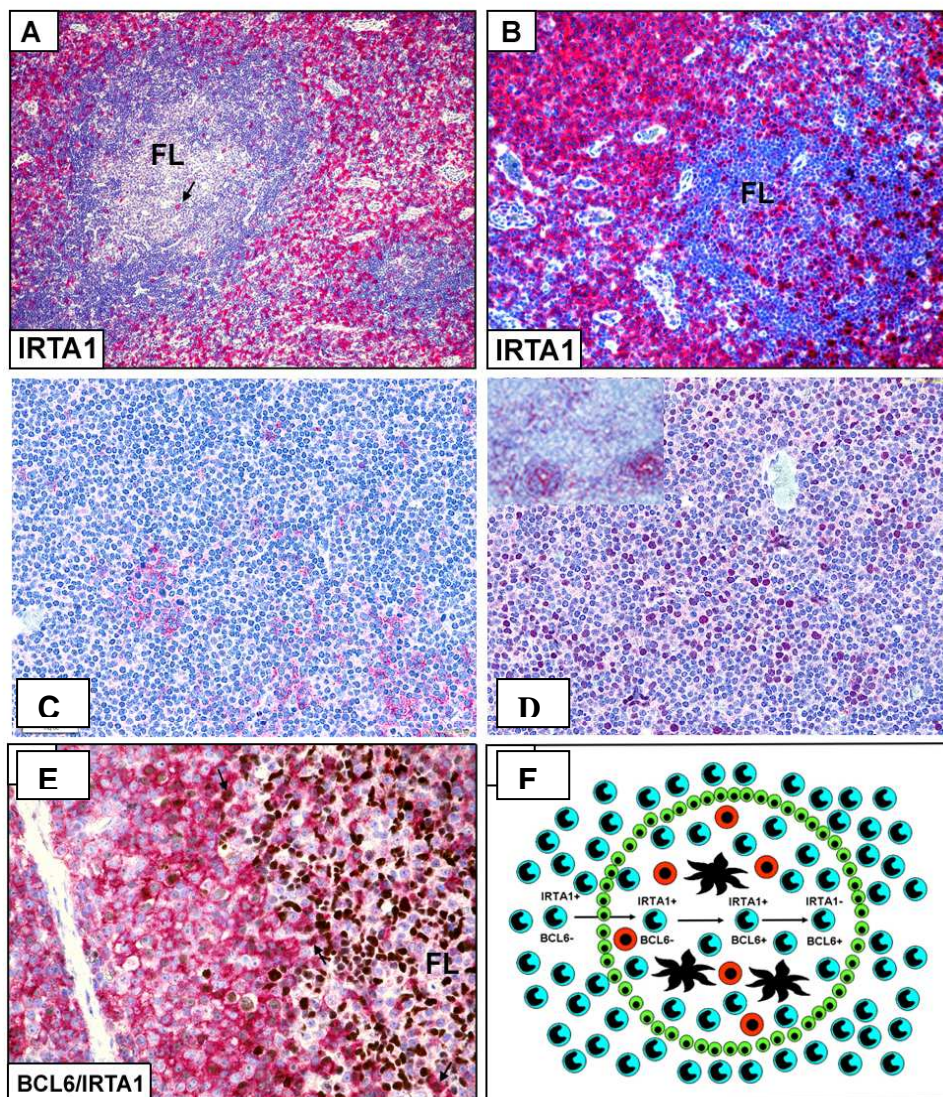


Figura 5

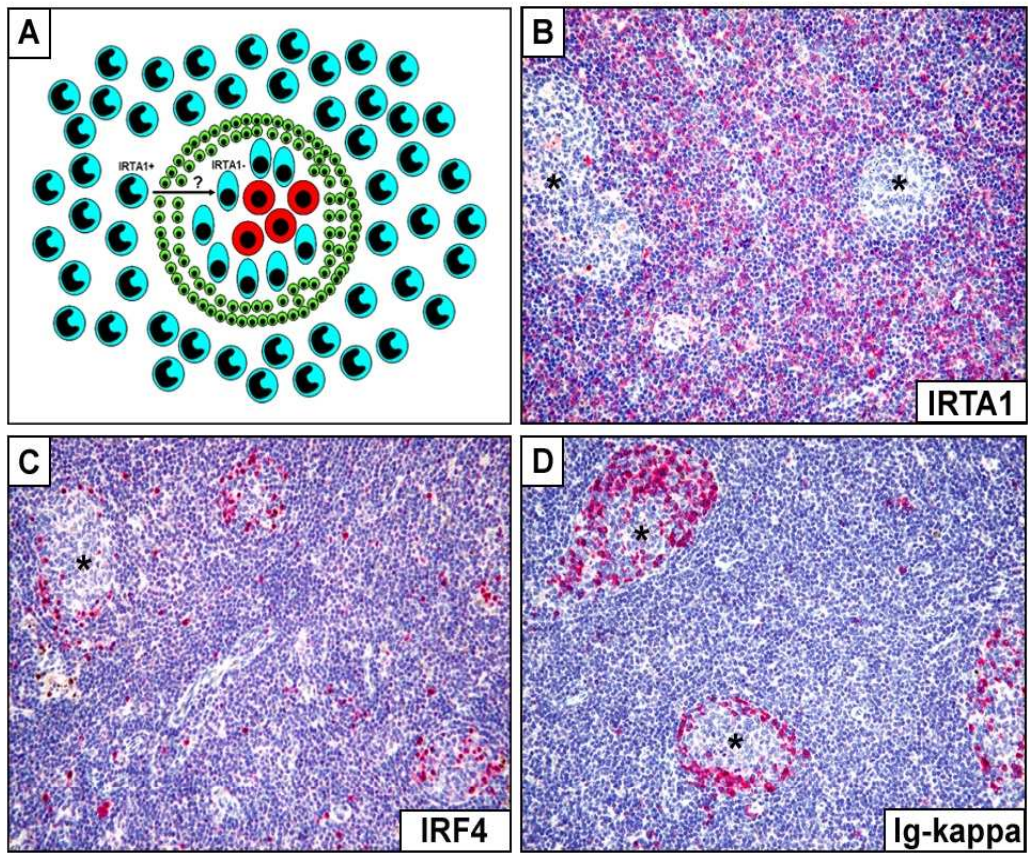


Figura 6

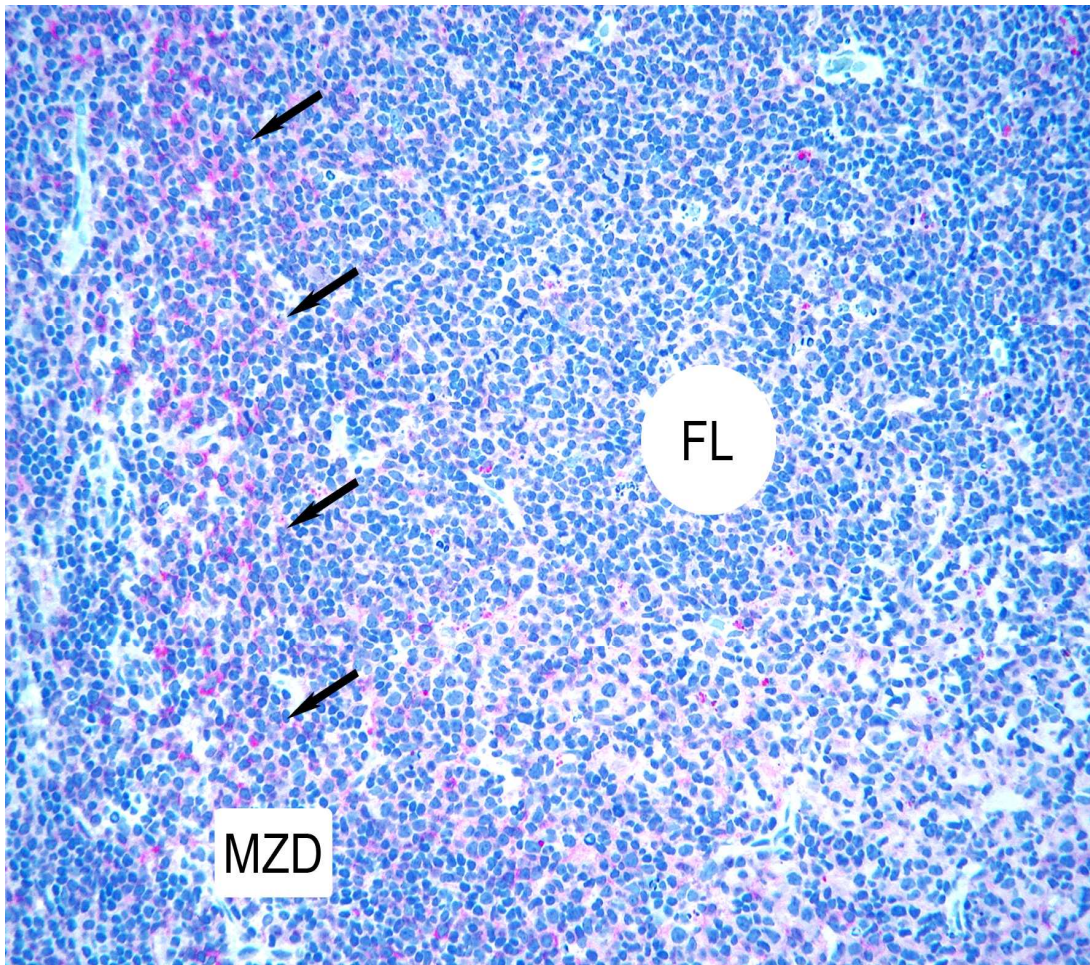
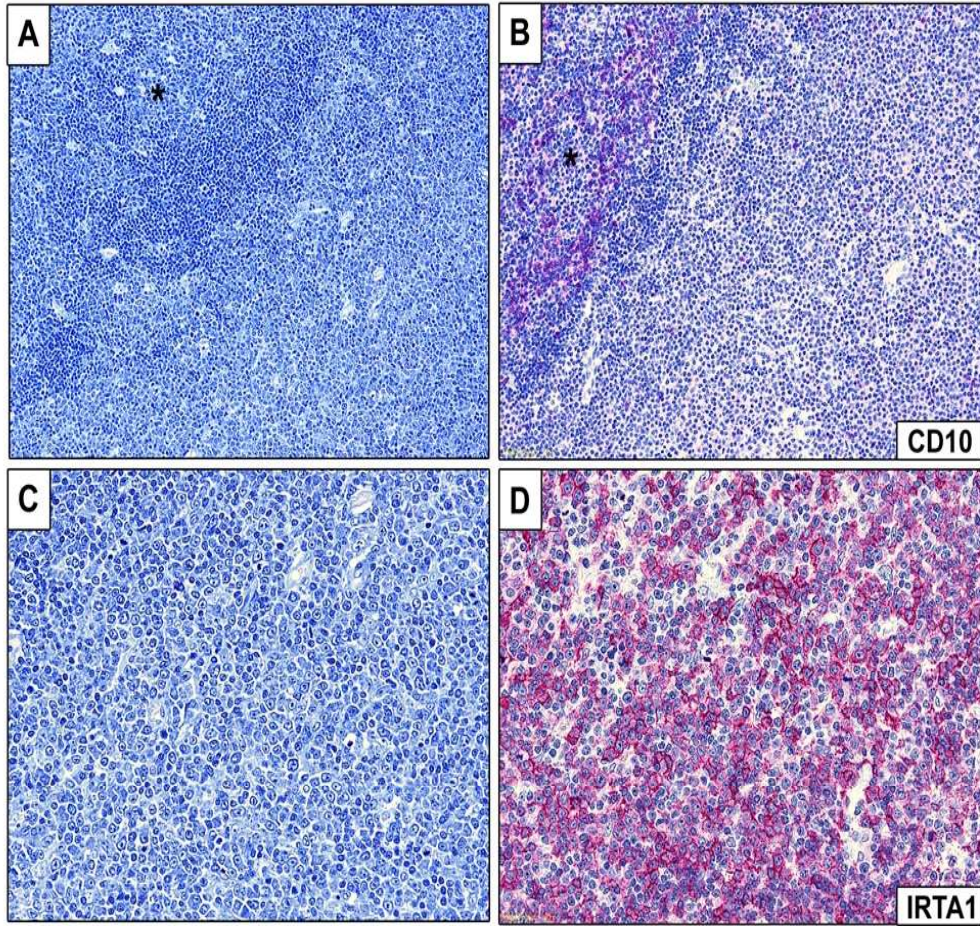


Figura 7



BIBLIOGRAFIA

1. Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri S, Stein H, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematolopoietic and Lymphoid Tissues*. International Agency for Research in Cancer (IARC), Geneva; 2008.
2. Hatzivassiliou G, Miller I, Takizawa J, Palanisamy N, Rao PH, Iida S, et al. IRTA1 and IRTA2, novel immunoglobulin superfamily receptors expressed in B cells and involved in chromosome 1q21 abnormalities in B cell malignancy. *Immunity* 2001;**14**:277-289.
3. Miller I, Hatzivassiliou G, Cattoretti G, Mendelsohn C, Dalla-Favera R. IRTAs: a new family of immunoglobulinlike receptors differentially expressed in B cells. *Blood* 2002;**99**:2662-2669.
4. Davis RS, Wang YH, Kubagawa H, Cooper MD. Identification of a family of Fc receptor homologs with preferential B cell expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;**98**:9772-9777.
5. Maltais LJ, Lovering RC, Taranin AV, Colonna M, Ravetch JV, Dalla-Favera R, et al. New nomenclature for Fc receptor-like molecules. *Nat Immunol* 2006;**7**:431-432.
6. Qiu WQ, de Bruin D, Brownstein BH, Pearse R, Ravetch JV. Organization of the human and mouse low-affinity Fc gamma R genes: duplication and recombination. *Science* 1990;**248**:732-735.
7. Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science*. 2000;**290**:84-89.

8. DeLisser HM, Newman PJ, Albelda SM. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 1994;**15**:490-495.
9. Falini B, Tiacci E, Pucciarini A, Bigerna B, Kurth J, Hatzivassiliou G, et al. Expression of the IRTA1 receptor identifies intraepithelial and subepithelial marginal zone B cells of the mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). *Blood* 2003;**102**:3684-3692.
10. Isaacson PG, Norton AJ. *Extranodal Lymphomas*. Churchill Livingstone; 1994.
11. Sheibani K, Fritz RM, Winberg CD, Burke JS, Rappaport H. "Monocytoid" cells in reactive follicular hyperplasia with and without multifocal histiocytic reactions: an immunohistochemical study of 21 cases including suspected cases of toxoplasmic lymphadenitis. *Am J Clin Pathol* 1984;**81**:453-458.
12. Stein H, Lennert K, Mason DY, Liangru S, Ziegler A. Immature sinus histiocytes. Their identification as a novel B-cell population. *Am J Pathol* 1984;**117**:44-52.
13. Kojima M, Nakamura S, Itoh H, Yoshida K, Shimizu K, Motoori T, et al. Occurrence of monocytoid B-cells in reactive lymph node lesions. *Pathol Res Pract* 1998;**194**:559-565.
14. Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, et al. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood* 2000;**95**:2084-2092.
15. Flenghi L, Bigerna B, Fizzotti M, Venturi S, Pasqualucci L, Pileri S, et al. Monoclonal antibodies PG-B6a and PG-B6p recognize, respectively, a

highly conserved and a formol-resistant epitope on the human BCL-6 protein amino-terminal region. *Am J Pathol* 1996;**148**:1543-1555.

16. Went P, Agostinelli C, Gallamini A, Piccaluga PP, Ascani S, Sabattini E, et al. Marker expression in peripheral T-cell lymphoma: a proposed clinical-pathologic prognostic score. *J Clin Oncol* 2006;**24**:2472-2479.

17. Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, et al. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol* 1997;**183**:116-123.

18. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, et al. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 1984;**32**:219-229.

19. Haralambieva E, Banham AH, Bastard C, Delsol G, Gaulard P, Ott G, et al. Detection by the fluorescence in situ hybridization technique of MYC translocations in paraffin-embedded lymphoma biopsy samples. *Br J Haematol* 2003;**121**:49-56.

20. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2006;**8**:141-151.

21. Campo E, Pileri S, Jaffe ES, Muller-Hermelink HK, Nathwani BN. Nodal marginal zone lymphoma. In: Swerdlow SH et al., eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. International Agency for Research on Cancer (IARC), Geneva; 2008:218-219.

22. Rinaldi A, Mian M, Chigrinova E, Arcaini L, Bhagat G, Novak U, et al. Genome-wide DNA profiling of marginal zone lymphomas identifies subtype-specific lesions with an impact on the clinical outcome. *Blood* 2010;**117**:1595-1604.
23. Isaacson P, Wright DH. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer* 1983;**52**:1410-1416.
24. Isaacson PG, Chott A, Nakamura S, Muller-Hermelink HK, Harris NL, Swerdlow SH. Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma). In: Swerdlow SH et al, eds., *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. International Agency for Research on Cancer (IARC), Geneva; 2008:214-217.
25. Garcia M, Konoplev S, Morosan C, Abruzzo LV, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ. MALT lymphoma involving the kidney: a report of 10 cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol* 2007;**128**:464-473.
26. Isaacson PG, Chan JK, Tang C, Addis BJ. Low-grade B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue arising in the thymus. A thymic lymphoma mimicking myoepithelial sialadenitis. *Am J Surg Pathol* 1990;**14**:342-351.
27. Takagi N, Nakamura S, Yamamoto K, Kunishima K, Takagi I, Suyama M, et al. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue arising in the thymus of a patient with Sjogren's syndrome. A morphologic, phenotypic, and genotypic study. *Cancer* 1992;**69**:1347-1355.

28. Mosnier JF, Brousse N, Sevestre C, Flejou JF, Delteil C, Henin D, et al. Primary low-grade B-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue arising in the gallbladder. *Histopathology* 1992;**20**:273-275.
29. van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C, Desmet VJ. The marginal zone in the human reactive lymph node. *Am J Clin Pathol* 1986;**86**:475-479.
30. Stein K, Hummel M, Korbjuhn P, Foss HD, Anagnostopoulos I, Marafioti T, et al. Monocytoid B cells are distinct from splenic marginal zone cells and commonly derive from unmutated naive B cells and less frequently from postgerminal center B cells by polyclonal transformation. *Blood* 1999;**94**:2800-2808.
31. Camacho FI, Garcia JF, Sanchez-Verde L, Saez AI, Sanchez-Beato M, Mollejo M, et al. Unique phenotypic profile of monocytoid B cells: differences in comparison with the phenotypic profile observed in marginal zone B cells and so-called monocytoid B cell lymphoma. *Am J Pathol* 2001;**158**:1363-1369.
32. Sheibani K, Sohn CC, Burke JS, Winberg CD, Wu AM, Rappaport H. Monocytoid B-cell lymphoma. A novel B-cell neoplasm. *Am J Pathol* 1986;**124**:310-318.
33. Dono M, Burgio VL, Tacchetti C, Favre A, Augliera A, Zupo S, et al. Subepithelial B cells in the human palatine tonsil. I. Morphologic, cytochemical and phenotypic characterization. *Eur J Immunol* 1996;**26**:2035-2042.
34. Dono M, Zupo S, Augliera A, Burgio VL, Massara R, Melagrana A, et al. Subepithelial B cells in the human palatine tonsil. II. Functional characterization. *Eur J Immunol* 1996;**26**:2043-2049.

35. Dono M, Zupo S, Massara R, Ferrini S, Melagrana A, Chiorazzi N, et al. In vitro stimulation of human tonsillar subepithelial B cells: requirement for interaction with activated T cells. *Eur J Immunol* 2001;**31**:752-756.
36. Lazzi S, Bellan C, Tiacci E, Palumbo N, Vatti R, Oggioni M, et al. IRTA1+ monocytoid B cells in reactive lymphadenitis show a unique topographic distribution and immunophenotype and a peculiar usage and mutational pattern of IgVH genes. *J Pathol* 2006;**209**:56-66.
37. Mebius RE, Nolte MA, Kraal G. Development and function of the splenic marginal zone. *Crit Rev Immunol* 2004;**24**:449-464.
38. Spencer J, Perry ME, Dunn-Walters DK. Human marginal-zone B cells. *Immunol Today* 1998;**19**:421-426.
39. Attygalle AD, Liu H, Shirali S, Diss TC, Loddenkemper C, Stein H, et al. Atypical marginal zone hyperplasia of mucosa-associated lymphoid tissue: a reactive condition of childhood showing immunoglobulin lambda light-chain restriction. *Blood* 2004;**104**:3343-3348.
40. Kojima M, Morita Y, Shimizu K, Yoshida T, Yamada I, Togo T, et al. Immunohistological findings of suppurative granulomas of *Yersinia enterocolitica* appendicitis: a report of two cases. *Pathol Res Pract* 2007;**203**:115-119.