

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E PATOLOGIA SPERIMENTALE**

**PROGETTO N° 1 “ONCOLOGIA”
Ciclo XXV**

Settore concorsuale di afferenza: 06/D3

Settore scientifico disciplinare: MED/06

**IDENTIFICAZIONE DI UN PROFILO MOLECOLARE DI
RISCHIO NEI PAZIENTI PEDIATRICI AFFETTI DA LINFOMA
DI HODGKIN**

Presentata da: DOTT.SSA FLORA MARINO

**Coordinatore Dottorato
PROF. SANDRO GRILLI**

**Relatore
PROF. ANDREA PESSION**

Esame finale anno 2013

INDICE

INTRODUZIONE.....	5
LINFOMA DI HODGKIN.....	6
Epidemiologia.....	6
Eziologia.....	7
Patogenesi.....	7
Linfoma di Hodgkin e sistema immunitario.....	9
Stadiazione clinico-prognostica.....	10
Istopatologia.....	10
Stadiazione.....	13
Fattori prognostici clinico-biologici.....	14
DISEGNO E OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	16
MATERIALI E METODI.....	17
Revisione della letteratura.....	17
Pazienti.....	20
1. Reperimento del materiale istologico.....	20
2. Criteri di inclusione nello studio.....	21
Analisi molecolari.....	21
1. Estrazione dell'RNA dal materiale istologico.....	21
2. Disegno dei primers per ciascuno dei geni identificati dalla letteratura.....	21
3. Validazione degli assay TaqMan.....	22
4. Analisi in Real Time PCR.....	24
Analisi statistiche.....	24
RISULTATI.....	25
Analisi mediante Real time PCR.....	25
Analisi statistiche.....	25
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	36

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1. EFS pazienti pediatrici arruolati nel Protocollo di trattamento AIEOP LH 2004	5
Figura 2. Incidenza e mortalità del LH in base all'età	6
Figura 3. Incidenza tumori in età pediatrica	6
Figura 4. Secrezione di citochine disregolatorie da parte del LH	8
Figura 5. SUR relativa a 3 popolazioni di studio: (a) infiltrato cellulare con bassi livelli di TIA1 e alti livelli FOXP3, (b) infiltrato cellulare con alti livelli di TIA1 e bassi livelli FOXP3 (c) infiltrato cellulare con intermedi valori di TIA1 e FOXP3 (37)	9
Figura 6. FFP (1) e SUR (2) relative all'espressione di MAL (32)	18
Figura 7. Lista dei 14 geni risultati essere maggiormente predittivi di prognosi mediante analisi di regressione logistica (3)	18
Figura 8. A: elenco dei geni appartenenti ai 4 pathways funzionali differenti la cui espressione è risultata essere altamente predittiva di cattiva prognosi nel LH; C e D: FFP dopo definizione dei 2 gruppi di rischio (Low e Higt) (34)	19
Figura 9. <i>ABCC1</i> e "drug resistance" nel LH (33)	20
Figura 10. Risultati di espressione di <i>CASP 3</i> e <i>CYCS</i>	25
Figura 11. EFS relativa a <i>CASP3</i>	27
Figura 12. EFS relativa a <i>CYCS</i>	27
Figura 13. EFS relativa alla combinazione <i>CASP3/CYCS</i>	29
Figura 14. EFS relativa alla combinazione <i>CASP3/CYCS</i>	29
Figura 15. EFS relativa alla combinazione <i>CASP3/CYCS</i>	30
Figura 16. Via intrinseca ed estrinseca di induzione dell'apoptosi	31
Figura 17. Meccanismi effettori dei linfociti T CD8+ citotossici	33

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1. Caratteristiche fenotipiche delle cellule RS nei sottotipi istologici di linfoma di LH.....	12
Tabella 2. Classificazione in stadi secondo Cotswolds.....	13
Tabella 3. Fattori prognostici nel LH.....	14
Tabella 4. Analisi univariata dei fattori prognostici biologici e clinici del Protocollo MH'96- AIEOP-CNR (riportati sul Protocollo AIEOP LH2004).....	15
Tabella 5. Elenco geni e rispettivi pathway di appartenenza identificati dalla revisione della letteratura predittivi di outcome nel LH	17
Tabella 6. Disegno dei primers.....	22
Tabella 7. Caratteristiche cliniche dei pazienti.....	23
Tabella 8. Analisi univariata dei singoli parametri biologico-clinici	26
Tabella 9. Analisi di associazione mediante test di Fisher di <i>CASP3/CYCS</i>	28
Tabella 10. Analisi multivariata di <i>CASP3</i> e <i>CYCS</i>	30

INTRODUZIONE

Il Linfoma di Hodgkin (LH) è un linfoma maligno del sistema linfatico il cui tessuto tumorale è costituito da poche cellule neoplastiche, le cellule di Reed-Sternberg (RS) di derivazione dai linfociti B del centro germinativo, "immerse" in un contesto eterogeneo di popolazioni cellulari di accompagnamento (linfociti, eosinofili, neutrofili, etc.) che appaiono avere un ruolo biologico, non ancora del tutto chiaro nello sviluppo della neoplasia. I meccanismi patogenetici alla base di un linfoma così "strano" non sono ancora del tutto conosciuti.

Attualmente nonostante i miglioramenti nel trattamento, circa il 20-30% dei pazienti in stadio avanzato recidiva o muore per progressione di malattia, come riportato dalla curva che descrive l'EFS dei pazienti pediatrici arruolati nel Protocollo di trattamento AIEOP LH 2004 (Figura 1) e i correnti metodi predittivi basati sulle caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti non sono ancora sufficienti a consentire di individuare tale categoria di pazienti che potrebbe giovare di un trattamento modificato o intensificato.

Partendo dalla considerazione per cui, la risposta alla terapia, la sopravvivenza e la progressione tumorale sono variabili correlate con l'espressione di diversi oncogeni e di proteine ad azione soppressiva tumorale, diversi studi hanno cercato negli ultimi anni di indagare il possibile ruolo di molecole con potenziale oncogeno nella patogenesi del linfoma di Hodgkin, utilizzando metodiche di immunistochemica, biologia molecolare e più recentemente la valutazione del profilo di espressione genica (1)(2)(3)(4)(5) con lo scopo ultimo di identificare fattori prognostici, basati non solo sulle caratteristiche clinico-laboratoristiche (dimensioni delle masse, LDH, anemia, molecole solubili, etc.), ma anche sulle caratteristiche fenotipiche o di espressione di molecole biologicamente rilevanti nelle cellule RS. Tra questi l'espressione di p53, di bcl-2, CD20, p21waf1, p27kip1, prodotti del virus EBV, dell'indice di proliferazione, dell'indice apoptotico, la percentuale di linfociti citotossici attivati, con risultati non sempre coerenti o ancora preliminari (1)(6)(7)(8)(9)

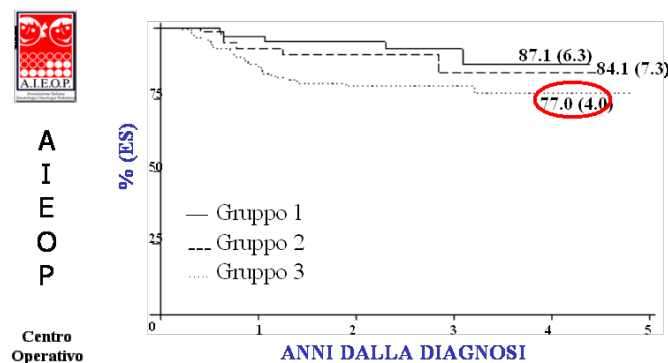


Figura 1. EFS pazienti pediatrici arruolati nel Protocollo di trattamento AIEOP LH 2004

LINFOMA DI HODGKIN

Epidemiologia

In Europa e negli Stati Uniti l'incidenza annuale è di circa 2.4-4 casi per 100.000 persone nel picco di incidenza a 25 anni, e di circa 5-7 casi per 100.000 nel secondo picco in età avanzata (Figura 2)(10)

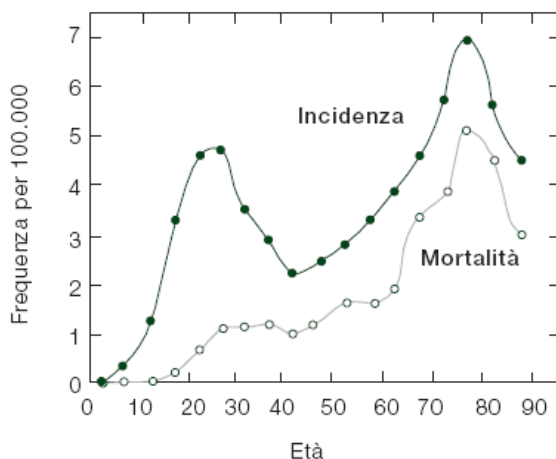


Figura 2. Incidenza e mortalità del LH in base all'età

L'incidenza del LH prevale nel sesso maschile, con un rapporto maschi:femmine di circa 2:1. Studi condotti su gemelli monozigoti, evidenziano anche una componente genetica nello sviluppo del LH, la cui penetranza sembra però molto bassa (11). In particolare, la variabilità di alcuni loci degli antigeni di classe II del sistema maggiore di istocompatibilità (MHC), comporterebbero un aumentato rischio di sviluppare un LH (varietà SN) (11)

In età pediatrica il LH costituisce circa il 6% di tutti i tumori (Figura 3). L'incidenza è di circa 4-6 nuovi casi/1.000.000 bambini/anno (età tra 0-15 anni) ed in Italia ci sono circa 50-60 nuovi casi/anno, con un rapporto maschi:femmine di 2,3:1, con un picco di incidenza dopo i 10 anni.

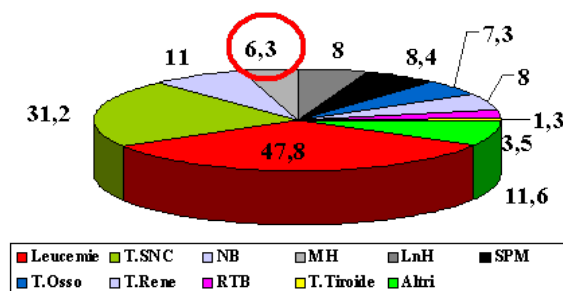


Figura 3. Incidenza tumori in età pediatrica

Eziologia

Una probabile eziologia di tipo infettivo del LH è stata ipotizzata sulla base di dati clinici, epidemiologici, sierologici e di tipo molecolare. In particolare, è stata dimostrata la presenza di proteine EBV-correlate e di RNA e/o DNA virale, nei tessuti linfonodali coinvolti da LH e nelle stesse cellule di RS in circa il 40% dei casi di LH (12)(13). Tuttavia, rimane tuttora da chiarire se, nei casi di LH EBV-associati, il virus rappresenti un semplice "passeggero silente" o possa piuttosto essere implicato nella trasformazione neoplastica dei progenitori delle cellule di RS. Non è infatti ancora chiaro quanto lo stato di immunodeficienza, tipico dei soggetti con LH e la mancata espressione degli antigeni di istocompatibilità di classe I da parte delle cellule di RS, possano contribuire alla inefficace risposta immune contro l'EBV.

Allo stato attuale l'ipotesi più probabile è che la malattia rappresenti la risposta finale comune a diversi eventi patologici quali infezioni virali, agenti ambientali e reazioni geneticamente determinate dall'ospite.

Patogenesi

Le cellule di RS del LH classico sembrano originare da precursori cellulari di lineage B (48). Tali precursori per meccanismi ancora ignoti sfuggirebbero alla morte apoptotica dando luogo dapprima ad una popolazione policlonale aberrante da cui emergerebbe, in fasi più tardive, una popolazione monoclonale dominante di cellule di RS (47).

L'identificazione della natura linfoide B delle cellule RS è confermata dalla dimostrazione immunohistologica di antigeni strettamente B-cell specifici. Il repertorio antigenico della cellula RS è inoltre coerente con la natura B centrofollicolare e comprende l'espressione di CD20 e di bcl-6, un fattore essenziale per la formazione del centro germinativo, che risulta soggetto a mutazioni nel HL (23). Più recentemente è stata dimostrata nelle cellule RS, espressione significativa di PAX-5/BSAP, un fattore di trascrizione specifico delle cellule B (24)

La presenza nei tessuti coinvolti da LH classico di una preponderante maggioranza di popolazioni cellulari non-neoplastiche (linfociti, eosinofili, monociti, neutrofilii, plasmacellule, cellule stromali), che circondano le cellule di RS e spesso si rapportano direttamente ad esse, rappresenta la caratteristica istopatologica tipica del LH. Le cellule di RS interagiscono con le popolazioni reattive attraverso il contatto cellulare diretto ed il rilascio di fattori di crescita e citochine, che reclutano ed attivano funzionalmente i vari tipi cellulari.(49). Le cellule reattive, a loro volta, producono una vasta serie di citochine solubili o presentano alle cellule tumorali

citochine ancorate alla membrana. In particolar modo, i linfociti T (CD4+/CD45R0+), i neutrofili, gli eosinofili e i monocito-macrofagi nel microambiente reattivo del LH, producono varie citochine tra le quali CD30L che induce nella cellula di RS un' aumentata stimolazione proliferativa associata ad una incrementata produzione autocrina di citochine, aumentata espressione di molecole di adesione (CD54) e di molecole costimolatorie, aumentata secrezione di CD30 solubile. Sempre i linfociti T e gli eosinofili producono inoltre CD40L una citochina che oltre a indurre aumentata stimolazione proliferativi analogamente a CD30L, agisce inducendo nella cellula di RS incremento della crescita clonogenica, riduzione della morte cellulare programmata, aumentata (mediante *rescue* apoptotico) espressione della proteina bcl-2. I linfociti T producono inoltre IL 2 che indurrebbero la cellula di RS ad aumentare della produzione autocrina di IL-9 con conseguente ulteriore stimolo proliferativi.

Il risultato di questo complesso network interattivo tra cellule di RS e le popolazioni cellulari reattive favorirebbe la proliferazione ed espansione delle cellule tumorali nel LH. Uno schema di tali interazioni e delle citochine coinvolte è illustrato in figura.4.

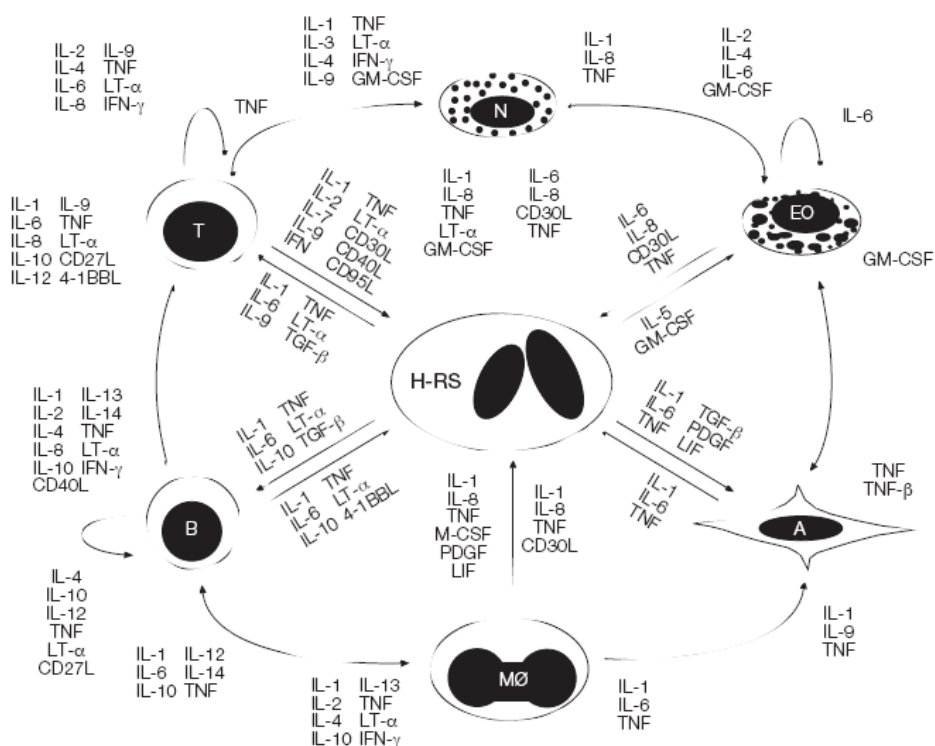


Figura 4. Secrezione di citochine disregolatorie da parte del LH

Linfoma di Hodgkin e sistema immunitario

I pazienti con LH, ed in particolare quelli con malattia in stadio avanzato, presentano un severo deficit acquisito dell'immunità cellulo-mediata; ciò a fronte della presenza, a livello del tessuto linfonodale coinvolto dal linfoma, di una imponente componente di T-linfociti funzionalmente e fenotipicamente attivati (25). L'interazione tra le cellule di RS e linfociti T, nei tessuti del LH, risulta infatti nella generazione di una potente reazione immune T-dipendente, che appare però anergica e comunque inefficiente sotto il profilo anti-tumorale

Le basi biologiche del deficit nell'immunità cellulo mediata appaiono non del tutto chiare. La produzione di TGF- β , IL-4 e IL-10, citochine ad azione immunosoppressiva, da parte delle cellule di RS e di alcune popolazioni reattive, e la mancata espressione degli antigeni MHC di classe I da parte delle cellule di RS, potrebbero in parte esserne responsabili.

Inoltre, paradossalmente è stato dimostrato che un'alta incidenza di infiltrati cellulari ad attività citotossica nel microambiente reattivo del LH (linfociti T CD8 (+), natural killer CD57 (+) e cellule granzyme B+) è una condizione che correla con una peggior prognosi (36). In particolare modo è stato osservato che la contemporanea associazione di alta incidenza di linfociti T ad azione citotossici (granzyme B+ and TIA-1) e ridotta presenza di marcatori di regolazione dei linfociti T citotossici (FOXP3) nel background reattivo del LH rappresenta uno dei meccanismi alla base dell'inibizione della risposta immune antitumorale (Figura 5)(37).

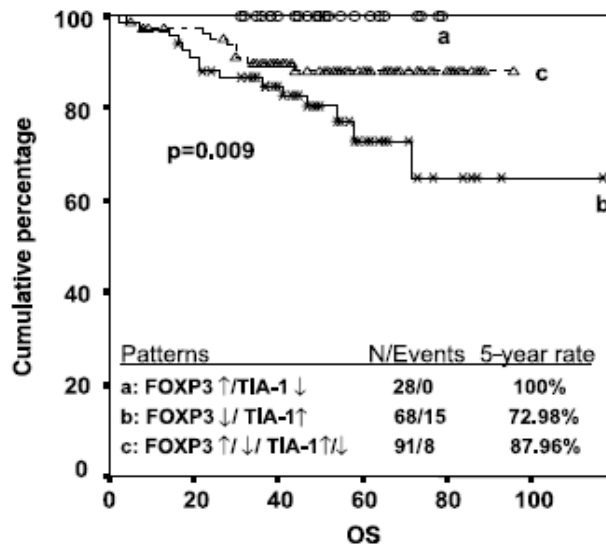


Figura 5. SUR relativa a 3 popolazioni di studio: (a) infiltrato cellulare con bassi livelli di TIA1 e alti livelli FOXP3, (b) infiltrato cellulare con alti livelli di TIA1 e bassi livelli FOXP3 (c) infiltrato cellulare con intermedi valori di TIA1 e FOXP3 (37)

Nel LH le cellule di RS agirebbero come potenti effettori APC, in grado di stimolare una imponente reazione cellulare ad opera di linfociti T CD4+ anergici, che in base alla loro capacità di secernere alcune citochine tipo Th2, che sembrano regolare positivamente la crescita delle cellule tumorali, invece di eliminarle (25)(26)(27)(28)(29).

È possibile quindi concludere che i precursori delle cellule di RS del LH classico possano essere identificati in cellule linfoidei aberranti, per lo più appartenenti al *lineage* B. Tali cellule sono in grado di reclutare ed attivare, attraverso un complesso *network* di citochine solubili e molecole di membrana, una serie di popolazioni cellulari non-neoplastiche (linfociti T, eosinofili, granulociti, plasmacellule, etc.), che costituiscono la preponderante cellularità nei tessuti coinvolti da LH. Tali cellule sono inoltre in grado di comportarsi come vere e proprie *antigen presenting cells* anomale, in grado di interagire con le cellule T ed altri elementi del sistema immune, stimolando la generazione di una intensa, ma inefficace, risposta immunitaria che, attraverso un complesso *network* di citochine ed interazioni cellulari contatto-dipendenti, non risulta nella eliminazione delle cellule tumorali ma, paradossalmente, ne sostiene la sopravvivenza ed espansione. Tale anomala risposta immunitaria e la liberazione sistemica e microambientale di citochine, sono alla base di molte delle manifestazioni cliniche tipiche di questo linfoma.

Stadiazione clinico-prognostica

Uno *staging* accurato e l'individuazione dei fattori prognostici all'esordio di malattia rappresentano una premessa fondamentale per fornire al paziente affetto da LH un trattamento ottimale in termini sia di risultati terapeutici, che di minori complicanze a lungo termine.

Istopatologia

La diagnosi di LH avviene attraverso l'uso combinato di tecniche istopatologiche e immunoistochimiche. Essa prevede l'utilizzo della classificazione in quattro categorie istopatologiche identificate nel 1965 nella conferenza di Rye: sclerosi nodulare (SN), cellularità mista (CM), deplezione linfocitaria (DL) e predominanza linfocitaria (PL). La classificazione REAL (Revised European American Lymphoma Classification), presentata recentemente dal gruppo internazionale per lo studio dei linfomi (14)(13), include e mantiene le categorie di Rye, che costituiscono il LH cosiddetto "classico", tenendo invece distinta la varietà nodulare del LH a PL (LHPLN), come entità clinico-patologica autonoma (13)(16)(17).

1. **Linfoma di Hodgkin nodulare a prevalenza linfocitaria** (NLPHD): caratterizzato dalla presenza di cellule atipiche, definite L&H (lymphocytic/histiocytic). La diagnosi istopatologica

si basa sul riconoscimento di queste cellule nel contesto di un tessuto linfoide alterato, strutturato in ampi noduli di derivazione follicolare. Il fenotipo delle cellule L&H è chiaramente linfoide B, con espressione di antigeni B-associati di membrana (CD20, CD79a), ed espressione significativa di bcl-6 nucleare (che conferma la loro derivazione centrofollicolare). Le cellule L&H non esprimono CD30 e CD15, nè livelli apprezzabili di p53, o mdm2 (18) a conferma della differenza significativa dalle forme classiche di HL. La natura centrofollicolare del microambiente in cui si sviluppa il nodulo del NLPHD è confermata dalla presenza di cellule follicolari dendritiche e di linfociti T centrofollicolari, caratterizzati dall'espressione di CD4, CD57 (e bcl-6 come recentemente dimostrato)(19). Dal punto di vista patogenetico il vantaggio proliferativo nella variante NLPHD può essere correlato a difetti dell'induzione dell'apoptosi per carente espressione di caspase-3(20)

2. Linfoma di Hodgkin classico:

- Sclerosi nodulare: l'aspetto nodulare in queste forme è variabile. Sono frequenti aree diffuse, ed anche circoscritti fenomeni di necrosi. Le cellule RS assumono spesso l'aspetto di "cellula lacunare". Il numero di cellule RS varia notevolmente da caso a caso, ed anche in differenti zone dello stesso campione biotico, fino a forme così ricche di cellule atipiche da costituire una variante "sinciziale" , che può essere erroneamente interpretata come linfoma anaplastico. Le diversità biologiche e fenotipiche esistenti tra linfoma ALCL, linfoma T caratterizzato da fenotipo e caratteristiche molecolari peculiari, coinvolgenti il gene ALK (2p23), ed HL, neoplasia essenzialmente di natura B, consente oggi una agevole diagnosi differenziale (21).
- Cellularità mista: il sovertimento strutturale del linfonodo è di tipo diffuso e la nodularità, quando presente è molto sfumata e priva di bande di sclerosi. Le cellule RS sono frequentemente del tipo classico sia morfologicamente (plurinucleate e con ampi nucleoli) che fenotipicamente (CD30+, CD15+). L'infiltrato di accompagnamento comprende macrofagi, linfociti, plasmacellule, granulociti. E' relativamente frequente la dimostrazione di prodotti del virus EBV (in particolare LMP1 ed EBER).
- Prevalenza linfocitaria caratterizzato dalla presenza di cellule di RS, fenotipicamente e morfologicamente più affini alle cellule tumorali del LH classico che alle varianti L&H (*lymphocytic and/or histiocytic* cellule "pop corn") del LHPLN. (17)
- Deplezione linfocitaria rappresenta in alcuni casi una forma aggressiva di HL classico, in altri casi un linfoma anaplastico a grandi cellule CD30+ (ALCL), e come tale va riconosciuto. E' ancora poco chiaro se esistano casi di HL di tipo T. Sono in alcuni casi dimostrabili antigeni T-associati nelle cellule RS, ed in particolare molecole citotossiche

(TIA-1, granzyme, perforin)(22). Alcuni di questi casi possono evolvere in ALCL, e vanno quindi considerati come forme precoci di questa neoplasia.

La diagnosi istopatologica di LH oltre a basarsi sulle caratteristiche evidenziabili su preparati colorati con colorazioni standard (ematossilina/eosina) all'esame morfologico, prevede l'utilizzo costante di un ristretto panel di marcatori immunofenotipici per garantire la massima riproducibilità diagnostica e per ovviare ai problemi di identificazione di forme che possono morfologicamente mimare un LH.

Le caratteristiche fenotipiche tipiche delle cellule di RS identificate mediante tecniche di immunistochemica sono riportate in Tabella 1.

Sottotipo istologico	Tipo di cellula neoplastica	Assetto fenotipico
Hodgkin "classico"		
Sclerosi nodulare	RS	CD30+, CD40+, CD15+/-, CD45-, EMA-, CDw75+, Pan T-, Pan-B (CD20, CD79a)+/-, BB-4+, J chains-, EBV+ (40%), Ig (G/R), TCR (G)
Cellularità mista	RS	CD30+, CD40+, CD15+/-, CD45-, EMA-, CDw75+, Pan T-/+ , Pan-B (CD20, CD79a)+/-, BB-4+, J chains-, EBV+ (60%), Ig (G), TCR (G)
Deplezione linfocitaria	RS	CD30+, CD40+, CD15+/-, CD45-, EMA-, Pan T-, Pan-B (CD20, CD79a)-, BB-4+, J chains-, Ig (G), TCR (G)
Predominanza linfocitaria "diffusa" (lymphocyte-rich classical Hodgkin's disease)**	RS	CD30+, CD40+, CD15+/-, CD45-, EMA-, CDw75+, Pan T-, Pan-B (CD20, CD79a)+/-, J chains-, EBV+/-, Ig (G/R),
Predominanza linfocitaria		
Nodulare	L&H	CD30-/+ , CD40+, CD15-, CD45+, EMA+/-, CDw75+, Pan T-, Pan-B (CD19, CD20, CD22, CD79a)+, BB-4-, J chains+, EBV-, Ig (R/G), TCR (G)

(EBV) presenza di genoma e/o proteine correlate al virus di Epstein Barr; (Ig), geni per le immunoglobuline; (TCR), T cell receptor; (G) configurazione germline; (R) configurazione riarrangiata

Tabella 1. Caratteristiche fenotipiche delle cellule RS nei sottotipi istologici di linfoma di LH

In età pediatrica le varietà istologiche di più frequente riscontro sono la PL nei bambini, la CM nei pazienti di età inferiore ai 10 anni, e la SN in quelli tra 11 e 15 anni.

I notevoli successi nel trattamento hanno tuttavia notevolmente ridotto il valore prognostico del sottotipo istologico nel LH, tanto che, in un'analisi della casistica di Stanford, non è stata osservata alcuna differenza significativa nella sopravvivenza dei pazienti con LH a varietà SN o CM (31).

Stadiazione

Originariamente per la stadiazione dei pazienti affetti da LH era stata proposta la classificazione di Ann Arbor che suddivide i pazienti in 4 stadi, ulteriormente suddivisi in categorie A e B a seconda della presenza o meno di sintomi (febbre $> 38^{\circ}$, perdita $>10\%$ peso corporeo, sudorazione notturna profusa, prurito). Tale classificazione è stata poi rivista e completata alla Conferenza di Cotswolds nel 1986 (30). (Tabella 2)

STADIO I	Interessamento di una singola regione linfonodale o struttura linfoide (ad esempio milza, timo, anello di Waldeyer)
STADIO II	Interessamento di due o più regioni linfonodali dallo stesso lato del diaframma (il mediastino, costituisce una singola sede, i linfonodi ilari un'altra sede). Il numero delle sedi anatomiche deve essere indicato da un suffisso (esempio II3)
STADIO III	Interessamento di regioni o strutture linfonodali da entrambi i lati del diaframma III1: con o senza adenopatie dell'ilo splenico, epatico e del tripode celiaco III2: con adenopatie para-aortiche, iliache, mesenteriche
STADIO IV	Interessamento di una o più sedi extralinfonodali la cui compromissione non sia quella "E"
"A"	Assenza di segni sistemici
"B"	Presenza di segni sistemici (febbre $> 38^{\circ}\text{C}$, sudorazione prevalentemente notturna, perdita di peso corporeo $> 10\%$ nei 6 mesi precedenti la diagnosi istologica)
"X"	Adenopatia massiva (bulky) intesa come: allargamento del mediastino $> 1/3$ o massa linfonodale $> 10\text{ cm } \emptyset$
"E"	Interessamento di una singola struttura extralinfonodale ma contigua o prossimale a una sede linfonodale coinvolta da malattia
"SC"	Stadio clinico
"SP"	Stadio patologico

Tabella 2. Classificazione in stadi secondo Cotswolds

Secondo i più recenti risultati del gruppo di Stanford (Tabella 3), tuttavia, ai fini della prognosi, rimangono in realtà validi solo due gruppi: stadi I-II-III A (prognosi favorevole), e stadi III B e IV (prognosi sfavorevole) (31).

Istituzioni	GHSB	EORTC	NCIC and ECOG	Stanford
Fattori di rischio	a) Large mediastinal mass b) Extranodal disease c) ESR ≥ 50 without B-symptoms or ≥ 30 with B-symptoms d) ≥ 3 nodal areas	a) Large mediastinal mass b) Age ≥ 50 years c) ESR ≥ 50 without B symptoms or \geq with B-symptoms d) ≥ 4 nodal areas CS I-II (supradiaphragmatic) without risk factors CS I-II (supradiaphragmatic) with ≥ 1 risk factors	a) Histology other than LP/NS b) Age ≥ 40 years c) ESR ≥ 50 d) ≥ 4 nodal areas CS I-II without risk factors CS I-II with ≥ 1 risk factors	a) B-symptoms b) Large mediastinal mass CS I-II without risk factors CS I-II with ≥ 1 risk factors
Favorevole	CS I-II without risk factors	CS I-II (supradiaphragmatic) without risk factors	CS I-II without risk factors	CS I-II without risk factors
Sfavorevole	CS I or CS IIA with ≥ 1 risk factors CS IIB with c) or d) but without a) and b)	CS I-II (supradiaphragmatic) with ≥ 1 risk factors	CS I-II with ≥ 1 risk factors	CS I-II with ≥ 1 risk factors

Tabella 3. Fattori prognostici nel LH

Fattori prognostici clinico-biologici

Nell'ambito della popolazione pediatrica affetta da LH registrata nel protocollo nazionale AIEOP-MH'96-CNR, è stata eseguita un'analisi univariata volta a identificare quali caratteristiche cliniche-biologiche rappresentavano in tale popolazione un fattore prognostico predittivo di outcome. Sulla base dell'analisi univariata svolta, solo la VES (≥ 40 mm/h e ≥ 80 mm/h), l'età < 15 anni, i sintomi B, il calo ponderale e la risposta finale alla chemioterapia, costituiscono dei fattori prognostici capaci di influenzare in modo significativo l'outcome della malattia (Tabella 4).

L'analisi multivariata effettuata allo scopo di verificare il valore predittivo indipendente dei singoli fattori prognostici oggetto dello studio, ha evidenziato come la risposta parziale alla chemioterapia prima della terapia radiante, l'età > 15 anni, la presenza di sintomi B e il calo ponderale $> 10\%$ nei 6 mesi precedenti la diagnosi rappresentino variabili indipendenti capaci di influenzare negativamente la prognosi della malattia.

MH'96-AIEOP-CNR ANALISI UNIVARIATA dei FATTORI BIOLOGICI di PROGNOSI				
Fattore	N°	Eventi	FFP %	Univariata*
VES mm/h				
< 40	111	8	89.2±7.84	0.039
≥ 40	170	24	77.5±9.06	
< 80	179	16	86.3±6.86	0.036
≥ 80	102	16	74.9±12.15	
Ferritina ng/ml				
≤ 142	185	17	84.7±7.62	0.1178
> 142	59	10	79.9±11.39	
Emoglobina g/dl				
< 11.5	146	19	77.0±10.39	0.33
≥ 11.5	157	16	86.7±6.07	
Leucociti n°/mmc				
< 10000	175	15	88.4±6.86	0.067
≥ 10000	133	20	75.6±10.39	
Linfociti n°/mmc				
< 2000	145	20	79.7±8.67	0.14
≥ 2000	163	15	85.6±7.45	
Monociti n°/mmc				
< 600	176	23	80.9±7.45	0.31
≥ 600	132	12	85.6±	
Eosinofili n°/mmc				
< 250	206	22	85.4±5.88	0.80
≥ 250	102	13	79.2±10.98	
Piastrine n°/mmc				
< 400000	210	21	84.2±6.86	0.23
≥ 400000	97	14	79.5±10.39	

MH'96-AIEOP-CNR ANALISI UNIVARIATA dei FATTORI CLINICI di PROGNOSI				
Fattore	N°	Eventi	FFP %	Univariata*
Sesso				
Maschile	132	12	86.0±8.04	0.52
Femminile	188	24	81.5±7.25	
Età				
0-14 anni	276	27	85.2±5.68	0.035
15-17 anni	44	9	71.2±16.86	
Sintomi				
A	206	18	85.0±6.86	0.027
B	114	18	80.3±8.43	
Febbre > 38°C				
Sì	91	14	80.4±9.60	0.059
No	229	22	84.4±6.47	
Sudorazione				
Notturna				
Sì	50	9	79.6±12.15	0.089
No	270	27	83.7±6.08	
Calo ponderale				
Sì	39	8	75.2±15.29	0.023
No	281	28	84.3±5.88	
Istologia				
SN	221	27	80.3±7.25	0.12
CM	78	5	91.9±6.86	
Stadio				
I-II	192	19	85.6±6.47	0.30
III-IV	128	17	79.6±9.40	
Stazioni linfonodali				
< 4	223	23	85.1±6.07	0.24
≥ 4	97	13	78.1±11.56	
Sedi extralinfatiche				
Sì	64	11	75.5±13.33	0.098
No	256	25	85.4±5.88	
Massa mediastinica				
M/T>0.33	139	16	83.2±8.04	0.85
Ass.-M/T≤0.33	181	20	83.0±7.45	
Risposta dopo 2 cicli di chemioterapia**				
RC	60	5	89.4±8.82	0.38
RP > 50%	250	28	82.2±6.86	
Risposta prima di Radioterapia**				
RC	149	11	88.6±6.86	0.047
RP > 50%	150	20	79.9±8.62	

Tabella 4. Analisi univariata dei fattori prognostici biologici e clinici del Protocollo MH'96-AIEOP-CNR (riportati sul Protocollo AIEOP LH2004)

DISEGNO E OBIETTIVO DELLO STUDIO

Nonostante i miglioramenti nel trattamento, ancora oggi circa il 20-30% dei pazienti affetti da LH in stadio avanzato recidiva o muore per progressione di malattia e i correnti metodi predittivi basati sulle caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti non sono ancora sufficienti a consentirci di individuare tale categoria di pazienti.

Partendo da questa considerazione, a gennaio 2010 è stato intrapreso uno studio retrospettivo condotto su pazienti pediatrici affetti da LH omogeneamente trattati presso tutti i centri di Oncoematologia Pediatrica AIEOP dal 2004 in poi.

L'obiettivo dello studio è stato quello di definire, in tali pazienti, un profilo molecolare di rischio che correli con la resistenza al trattamento e con l'outcome e che, utilizzato in sinergia con i correnti metodi predittivo-prognostici, possa consentire già all'esordio di malattia, di identificare quel 20-30% circa di pazienti che sfugge ai trattamenti e muore per recidiva o progressione di malattia e che potrebbe pertanto giovare di un trattamento alternativo o intensificato.

Poiché il maggior limite all'inserimento nella pratica clinica degli studi di identificazione di marcatori molecolari è proprio la mancanza di una adeguata valutazione della loro effettiva capacità predittiva, abbiamo deciso di intraprendere uno studio di validazione di marcatori molecolari già identificati in studi esplorativi precedentemente pubblicati.

MATERIALI E METODI

Revisione della letteratura

Dall'analisi della letteratura è stato identificato un pannello di geni la cui espressione è risultata essere altamente predittiva di resistenza al trattamento nei pazienti affetti da LH (Tabella 5).

GENI	PATHWAY DI APPARTENENZA	BIBLIOGRAFIA
<i>MAL</i> <i>CTSL</i>	T-cell pathway	<i>Am J Clin Pathol</i> 2006;125:776-782 <i>Clin Cancer Res.</i> 2009 Feb 15; 15 (4) :1367-75
<i>BCCIP</i> <i>BCL2</i> <i>BCL2L1</i> <i>CASP3</i> <i>CYCS</i> <i>CCNE2</i> <i>CCNA2</i> <i>CDC2</i> <i>HMUR</i> <i>HMUR</i> <i>CENPF</i>	G1 pathway apoptosi pathway	<i>Clin Cancer Res.</i> 2009 Feb 15; 15 (4) :1367-75 <i>Blood</i> 2002 100: 3935-3941 <i>Blood.</i> 2010;116(8): e12-e17 <i>Clin Cancer Res.</i> 2009 Feb 15; 15 (4) :1367-75 <i>Clin Cancer Res</i> 2008;685 14(3)
<i>CSEL1</i> <i>RSN</i> <i>DCK</i> <i>TYMS</i> <i>ABCC1</i> <i>DNAJA2</i> <i>HSPA4</i> <i>HSP90AA1</i>	Gs pathway, proliferazione cellulare G2-M pathway	<i>Clin Cancer Res.</i> 2009 Feb 15; 15 (4) :1367-75 <i>Blood.</i> 2010;116(8): e12-e17
<i>STAT1</i> <i>ITGA4</i> <i>MMP11</i> <i>WHSC2</i> <i>WBP4</i> <i>LYZ</i> <i>IRF4</i>	drug resistance pathway chaperone pathway monocyte/macrophage pathway	<i>Clin Cancer Res.</i> 2009 Feb 15; 15 (4) :1367-75 <i>Blood.</i> 2010;116(3):418-427 <i>Clin Cancer Res.</i> 2009 Feb 15; 15 (4) :1367-75 <i>Clin Cancer Res.</i> 2009 Feb 15; 15 (4) :1367-75 <i>N Engl J Med.</i> 2010; 362(10): 875-885 <i>Blood.</i> 2010;116(8): e12-e17 <i>Blood.</i> 2010;116(8): e12-e17

Tabella 5. Elenco geni e rispettivi pathway di appartenenza identificati dalla revisione della letteratura predittivi di outcome nel LH

In un lavoro pubblicato su *Am J Clin Pathol* nel 2006 (32), mediante tecniche di immunoistochimica applicate su un campione di 86 pazienti affetti da LH di cui è stato analizzato il materiale istologico alla diagnosi, è stato ipotizzato che l'espressione di *MAL*, un gene che codifica

per una proteina di membrana coinvolta nel trasporto lipidico dei linfociti T e delle cellule epiteliali, identifichi una categoria di pazienti affetti da LH con cattiva prognosi. (Figura 6)

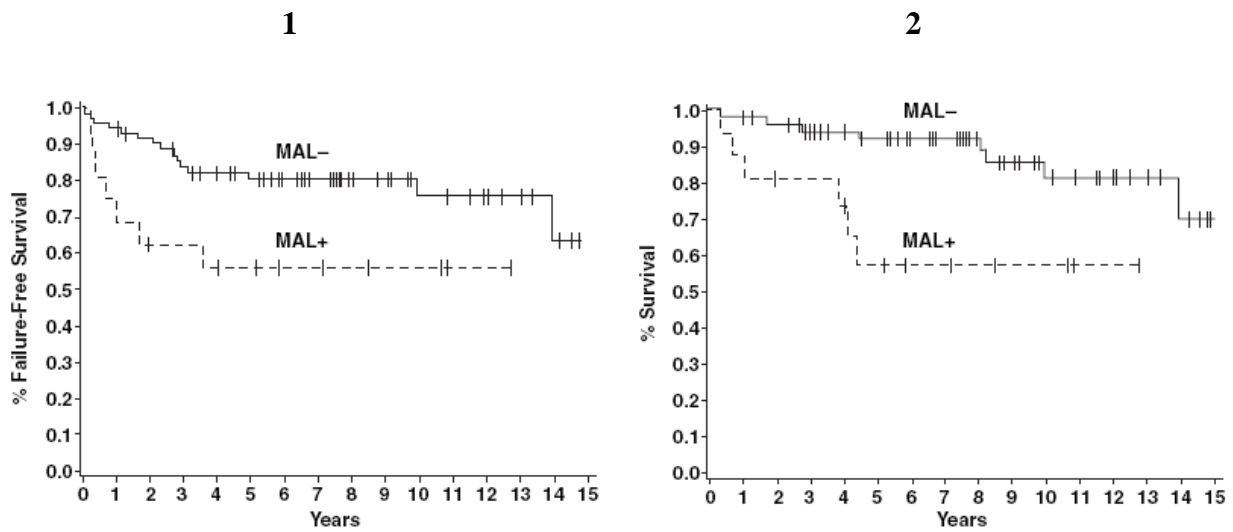


Figura 6. FFP (1) e SUR (2) relative all'espressione di MAL (32)

Sempre nel tentativo di identificare specifici marcatori molecolari associati con la resistenza al trattamento nel LH, in un lavoro pubblicato su *Clin Cancer Res* nel 2009, sono stati analizzati mediante analisi di espressione genica, i campioni ottenuti da 29 pazienti affetti da LH in stadio avanzato (14 responders e 15 non-responders al trattamento con ABVD). I geni e i pathway appartenenti sia alla cellula tumorale, sia al microambiente, risultati essere più differenziali fra i 2 gruppi di pazienti, sono stati selezionati e successivamente utilizzati per disegnare un assay in Real Time PCR validato su un set indipendente di 52 pazienti. Questo ha portato alla definizione di 14 geni risultati essere maggiormente predittivi di resistenza al trattamento nel LH. (Figura 7)(3)

Gene symbol	Gene name	Area under receiver operating characteristic curve	P
BCCIP	BRCA2 and CDKN1A interacting protein	0.756	0.008
CASP3	Caspase-3, apoptosis-related cysteine peptidase	0.765	0.006
CCNE2	Cyclin E2	0.656	0.051
CSEL1	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	0.657	0.050
CTSL	Cathepsin L	0.678	0.046
CYCS	Cytochrome c, somatic	0.753	0.009
DCK	Deoxycytidine kinase	0.747	0.010
DNAJA2	DNAJ (Hsp40) homologue, subfamily A, member 2	0.671	0.049
HSP90AA1	Heat shock protein 90 kDa α (cytosolic), class A member 1	0.662	0.050
HSPA4	Heat shock 70 kDa protein 4	0.659	0.050
ITGA4	Integrin, α_4 (antigen CD49D, α_4 subunit of VLA-4 receptor)	0.651	0.055
LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	0.674	0.047
RSN	Restin (Reed-Sternberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)	0.706	0.033
TYMS	Thymidylate synthetase	0.750	0.010

Figura 7. Lista dei 14 geni risultati essere maggiormente predittivi di prognosi mediante analisi di regressione logistica (3)

In un lavoro successivo pubblicato su *Blood* nel 2010 (34), gli stessi marcatori molecolari già identificati nello studio esplorativo precedentemente pubblicato su *Clin Cancer Res* nel 2009, sono stati valutati mediante Real Time PCR su un set indipendente di 262 pazienti adulti affetti da LH in stadio avanzato e questa validazione ha consentito di identificare 11 geni appartenenti a 4 pathways funzionali differenti la cui espressione è risultata essere altamente predittiva di cattiva prognosi nel LH (Figura 8).

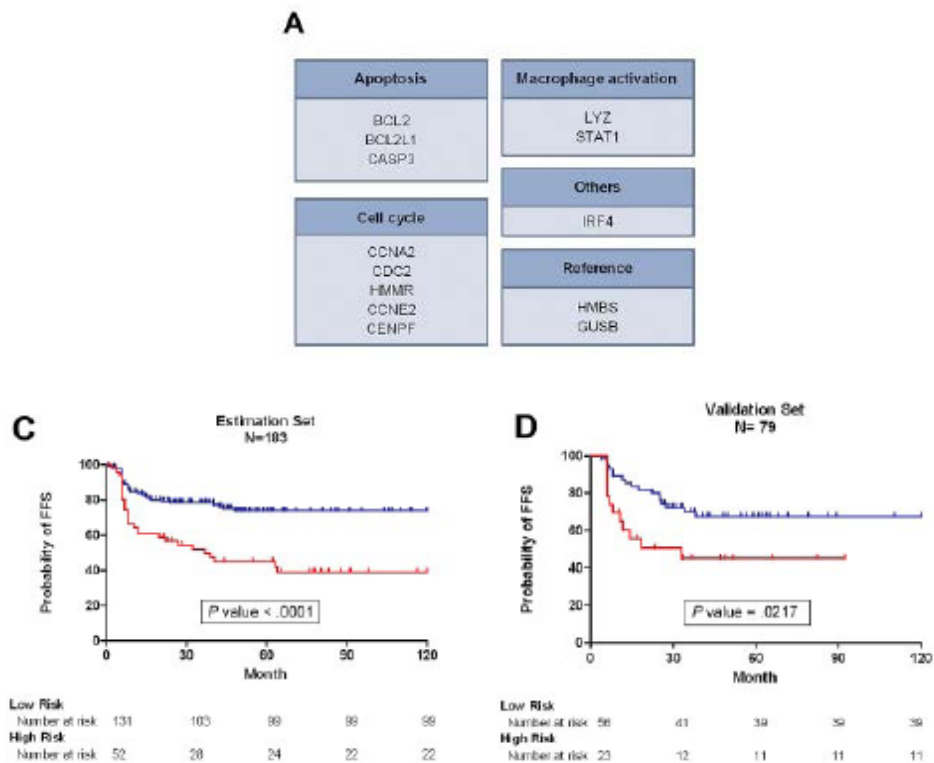


Figura 8. A: elenco dei geni appartenenti ai 4 pathways funzionali differenti la cui espressione è risultata essere altamente predittiva di cattiva prognosi nel LH; **C e D:** FFP dopo definizione dei 2 gruppi di rischio (Low e High) (34)

In un altro lavoro pubblicato nel 2010 su *Blood* (33) sono stati studiati mediante aCGH, 53 pazienti adulti affetti da LH ed è stato dimostrato che l'aumento del numero di copie della regione cromosomica 16p11.2-13.3 risulta essere significativamente più frequente nei pazienti non responsivi ai trattamenti chemioterapici e quindi con outcome peggiore. Inoltre è stata presa in considerazione una linea cellulare di LH resistente (KMH2) nella quale si è osservata iperespressione di *ABCC1* (16p13.11) ed è stato dimostrato che l'esposizione in vitro alla doxorubicina induce maggior tossicità in caso di silenziamento di *ABCC1*, suggerendo un ruolo di tale gene nei meccanismo di “drug resistance” (Figura 9)

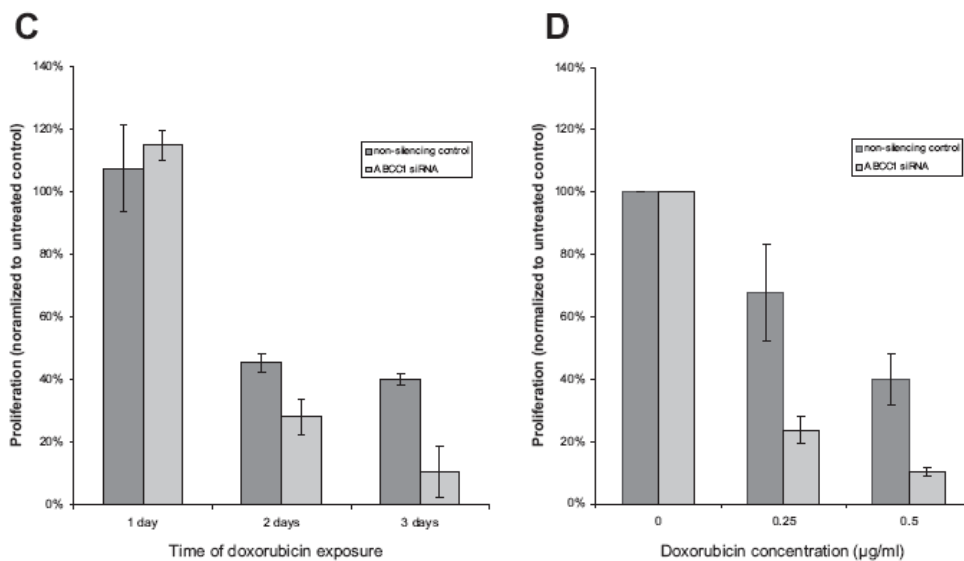


Figura 9. *ABCC1* e “drug resistance” nel LH (33)

Sempre nel 2010 sul *N Engl J Med* (40) è stato pubblicato un lavoro nel quale, mediante analisi di espressione genica, è stato analizzato il materiale istologico prelevato alla diagnosi da 130 pazienti adulti affetti da LH ed è stato dimostrato che nei pazienti resistenti ai trattamenti chemioterapici è presente una overespressione dei geni appartenenti al pathway di attivazione macrofagica. Tale dato è poi stato confermato mediante analisi di immunistochemica su un set indipendente di 166 pazienti nei quali è stata evidenziata una correlazione tra aumento del numero di cellule CD68 positive e resistenza al trattamento (*MMP11*, *WHSC2*, *WBP4* (pathway di attivazione macrofagica))

Pazienti

1. Reperimento del materiale istologico

Il materiale istologico prelevato alla diagnosi e rappresentato da tessuto patologico fissato in formalina e processato in paraffina relativo ai pazienti pediatrici affetti da LH omogeneamente trattati presso il Nostro Centro e presso tutti i Centri AIEOP italiani dal 1996 in poi è stato reperito presso il “Servizio di Emolinfopatia” del Policlinico Sant’Orsola-Malpighi (Prof. S. Pileri). Tale lavoro ha portato al reperimento del materiale istologico prelevato da una popolazione di studio così costituita: 64 pazienti totali di cui 45 ad outcome favorevole e 19 ad outcome sfavorevole.

2. Criteri di inclusione nello studio

- età compresa tra 0 e 16 anni
- diagnosi di Linfoma di Hodgkin
- schema di trattamento utilizzato comprendente chemioterapia standard ABVD-COPP/ABV (Doxorubicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbarbazina-Ciclofosfamida, Vincristina, Procarbazina, Prednisone/Doxorubicina, Bleomicina, Vinblastina) +/- Radioterapia come previsto dal Protocollo AIEOP LH-2006 nel gruppo terapeutico 1°, 2° e 3°.

Analisi molecolari

1. Estrazione dell'RNA dal materiale istologico

Dal materiale istologico fissato in formalina e processato in paraffina è stato successivamente estratto l'RNA. L'RNA totale dei campioni di LH inclusi in paraffina è stato estratto a partire da 5 fettine di 10 µm di spessore, deparaffinate mediante trattamento con il solvente HistoClear (National Diagnostics). L'estrazione è stata effettuata con il kit RecoverAll (Applied Biosystems), che prevede uno step di digestione mediante proteasi per eliminare le proteine legate covalentemente all'RNA, il trattamento con DNasi per digerire il DNA genomico e la successiva purificazione su filtri di borosilicato. Da tutti i campioni estratti è stata ottenuta una sufficiente quantità di RNA totale per la retrotrascrizione (2-30 µg). La sintesi del cDNA è stata effettuata con il kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Diagnostics), a partire da 1 µg di RNA totale, e utilizzando random hexamers come primer di reazione.

2. Disegno dei primers per ciascuno dei geni identificati dalla letteratura

Il disegno dei primers per quantitative PCR per ciascun gene evidenziato dalla letteratura è stato effettuato tramite TaqMan® Gene Expression Assays dell'Applied Biosystem (Tabella 6), imponendo una lunghezza massima di amplificazione di 100bp, per permettere l'amplificazione a partire da RNA degradato. La tecnologia TaqMan consente l'ottimale sensibilità e specificità di amplificazione del gene di interesse, riducendo i falsi positivi.

Gene Symbol	Gene Name	Ref Seq	Amplicon Length
BCCIP1	BRCA2 and CDKN1A interacting protein	NM_016567.3	76
CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_004346.3	66
CYCS	cytochrome c, somatic	NM_018947.4	85
CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	NM_001316.2	59
CLIP1	CAP-GLY domain containing linker protein 1	NM_198240.1	65
CTSL	cathepsin L1	NM_001912.4	66
DCK	deoxycytidine kinase	NM_000788.2	71
TYMS	thymidylate synthetase	NM_001071.2	60
DNAJA2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	NM_005880.3	85
HSPA4	heat shock 70kDa protein 4	NM_002154.3	62
HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	NM_001017963.2	67
ITGA4	integrin, alpha 4	NM_000885.4	61
ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	NM_019862.2	57
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	NM_000633.2	76
BCL2L1	BCL2-like 1	NM_138578.1	65
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	NM_007315	66
TYMS	thymidylate synthetase	NM_001071.2	88
ATXN2L	ataxin 2-like	NM_148416.1	83
WHSC2	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2	NM_005663.3	67
TET2	tet oncogene family member 2	NM_001127208.1	93
WBP4	WW domain binding protein 4	NM_007187.3	62
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8	NM_022720.5	77
CENPF	centromere protein F	NM_016343	76

Gene Symbol	Gene Name	Ref Seq	Amplicon Length
HMBS	hydroxymethylbilane synthase	NM_000190.3	62
GUSB	glucuronidase, beta	NM_000181.3	63

Tabella 6. Disegno dei primers

3. Validazione degli assay TaqMan

Dopo estrazione dell'RNA si è proceduto a validare l'efficienza degli assay TaqMan per verificare l'effettiva capacità di tali assay di amplificare geni a partire da campioni molto degradati.

I campioni estratti sono poi stati sottoposti a vari step di selezione sulla base di 3 diversi criteri:

- Quantità dell'RNA estratto:

Concentrazione > 50ng/μl

- Qualità dell'RNA estratto:

260/230 > 1,70.

- Valutazione in Realtime PCR di:- *valore dei Ct (ciclo soglia) geni di riferimento*
 - Ct dei geni di interesse

Questi step di selezione dei campioni, necessari per la validazione degli assay TaqMan, hanno considerevolmente ridotto la popolazione di studio: dei 64 campioni selezionati solo 37 sono stati realmente utilizzati per le analisi di espressione genica ed in particolare: 12 prelevati da pazienti ad outcome sfavorevole e 25 da pazienti ad outcome favorevole.

Le caratteristiche cliniche di tale popolazione sono state riportate qui di seguito (Tabella 7).

Caratteristiche	Numero	%
Sesso		
M	23	62.16
F	14	37.84
Età		
0-14 aa	24	64.86
15-16 aa	13	35.14
Stadio		
I e II	9	24.32
III	18	48.65
IV	10	27.03
Sintomi		
A	24	64.86
B	13	35.14
Mediastino (M/T>0.33)		
Sì	17	45.95
No	20	54.05
Istologia		
DL	1	2.70
PL	6	16.22
SN	30	81.08
Gruppo terapeutico		
1°	4	10.81
2°	11	29.73
3°	22	59.46
Outcome		
Favorevole	25	67.57
Sfavorevole	12	32.43

Tabella 7. Caratteristiche cliniche dei pazienti

4. Analisi in Real Time PCR

La quantificazione è stata effettuata attraverso il metodo del $\Delta\Delta C_t$ normalizzando il C_t del gene di interesse a quello del gene housekeeping, e riferendo tutte le quantificazioni ad un campione di riferimento, costituito dalla linea cellulare Jurkat. Per ogni gene e ogni campione sono stati effettuati da un minimo di tre ad un massimo di sei repliche di amplificazione.

L'espressione genica è stata confrontata fra i gruppi di pazienti recidivati e non mediante il test t di Student a due code, considerando come significativo il $p < 0.05$.

Il cutoff di espressione per i geni risultati significativamente diversi fra i due gruppi di pazienti è stato calcolato mediante analisi ROC, con l'obiettivo di minimizzare gli errori di classificazione, ovvero ottenere il miglior compromesso fra sensibilità e specificità del test.

Analisi statistiche

La sopravvivenza (SUR) e la sopravvivenza libera da eventi (EFS) sono state calcolate con il metodo di Kaplan-Meier (50); il confronto delle probabilità nei diversi gruppi dei pazienti è stato condotto con il log-rank test (51). Nell'analisi della EFS sono state considerate evento sia le non risposte alla terapia di induzione, sia le recidive o le progressioni di malattia, mentre nell'analisi della SUR sono state considerate evento le morti dovute a qualsiasi causa. I risultati sono stati espressi in probabilità (%) ed errore standard (SE).

Nell'analisi univariata dei fattori in grado di influenzare la EFS sono state valutate le seguenti variabili: età (0-14, >14 anni), sesso, sottotipo istologico (SN, DL+PL), stadio di malattia (I+II, III, IV) malattia Bulky (no M+M/T<0.33, M/T>0.33), presenza di sintomi (A, B), gruppo terapeutico (1°, 2°, 3°), livello di espressione di ciascun gene analizzato (alto, basso).

Per l'analisi multivariata dei fattori in grado di influenzare la EFS è stato utilizzato il metodo di regressione di Cox (52)

Tutti i valori di p sono a due code e valori inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato STATA 7.0 (Stata Corporation, 4905 Lakeway Drive, College Station, Texas 77845 USA).

RISULTATI

Analisi mediante Real time PCR

Dall'analisi eseguita mediante Real time PCR sui nostri 37 campioni selezionati, solamente in 2 dei 27 geni analizzati, il livello di espressione è risultato correlare significativamente con l'EFS.

Tali geni sono:

- *CASP 3* e *CYCS* (appartenenti al pathway apoptotico) che sono risultati down-regolati nella popolazione ad outcome sfavorevole (Figura 10)
- dei 25 geni rimanenti, solo 3, *BCL2L1* (coinvolto anch'esso nel pathway apoptotico) e *WHSC2* e *ITGA4* (coinvolti nel pathway di attivazione monocito-macrofagica) hanno mostrato una tendenza alla differenzialità tra le 2 popolazioni ad outcome differente, senza tuttavia che il dato di espressione risultasse statisticamente significativo (Figura 10)

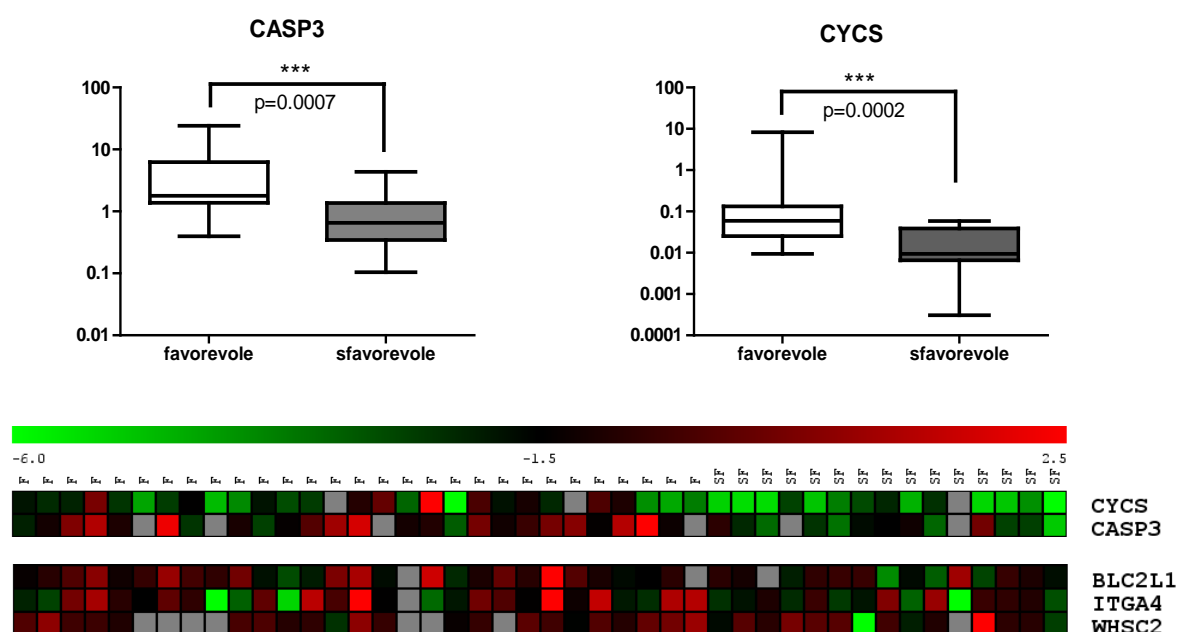


Figura 10. Risultati di espressione di *CASP 3* e *CYCS*
Mann-Whitney Test: *** p-value < 0.001

Analisi statistiche

Nella coorte di pazienti analizzata è emerso che la mediana di follow-up è di 57 mesi con un minimo di 21 e un massimo di 95 mesi.

Nella nostra popolazione di studio, l'EFS a 5 anni è risultata del 66.5% (SE 7.9) e la SUR globale dell'82.2% (SE 6.5), mostrando pertanto, un andamento peggiorativo rispetto alle curve di sopravvivenza descritte per i pazienti arruolati nel Protocollo AIEOP LH 2004.

L'analisi univariata dei singoli parametri biologico-clinici in grado di influenzare l'EFS (età, sesso, sottotipo istologico, stadio di malattia, malattia Bulky (M/T > 0.33), presenza di sintomi, gruppo terapeutico) non ha mostrato alcuna significatività statistica. Nella nostra coorte di pazienti pediatrici affetti da LH, tali parametri non rappresentano pertanto fattori predittivi di outcome (Tabella 8)

ANALISI UNIVARIATA dei FATTORI PROGNOSTICI BIOLOGICI e CLINICI				
Fattore	N° casi	N° eventi	EFS%	p
Sesso				
M	23	9	58.72 +/-10.70	0.38
F	14	4	78.57 +/-10.97	
Età				
0-14 aa	24	9	65.68 +/- 9.89	0.78
15-16 aa	13	4	68.38 +/- 13.15	
Sintomi				
A	24	9	65.20 +/-10.01	0.68
B	13	4	68.38 +/-13.15	
Istologia				
SN	30	10	69.17 +/-8.60	0.86
DL+PL	7	3	57.14 +/-18.70	
Stadio				
I-II	9	4	55.56 +/-16.56	0.61
III	18	7	64.81 +/-11.69	
IV	10	2	80.00 +/-12.65	
Mediastino				
Neg+M/T<0.33	20	7	64.62 +/-10.78	0.94
M/T>0.33	17	6	68.63 +/-11.74	
Gruppo terapeutico				
1°	4	3	25.00 +/-21.65	0.31
2°	11	3	72.73 +/-13.43	
3°	22	7	71.23 +/-10.01	

Tabella 8. Analisi univariata dei singoli parametri biologico-clinici

L'analisi univariata eseguita sui livelli di espressione dei 27 geni analizzati, ha invece mostrato significatività statistica per quanto riguarda l'espressione di *CASP3* e *CYCS*, 2 geni appartenenti al pathway di attivazione apoptotica. Il livello di espressione di tali geni è risultato pertanto nel nostro studio, una variabile in grado di influenzare l'EFS in modo significativo (Figura 11 e 12).

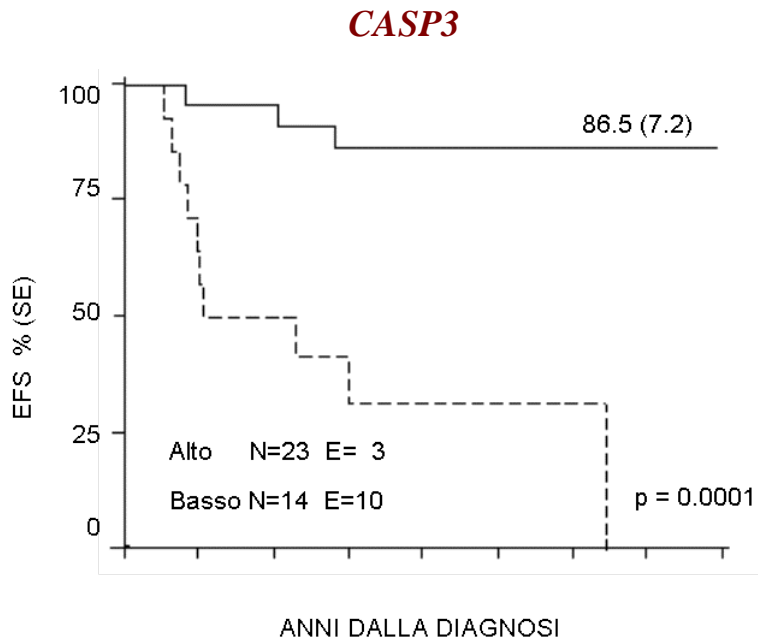


Figura 11. EFS relativa a *CASP3*

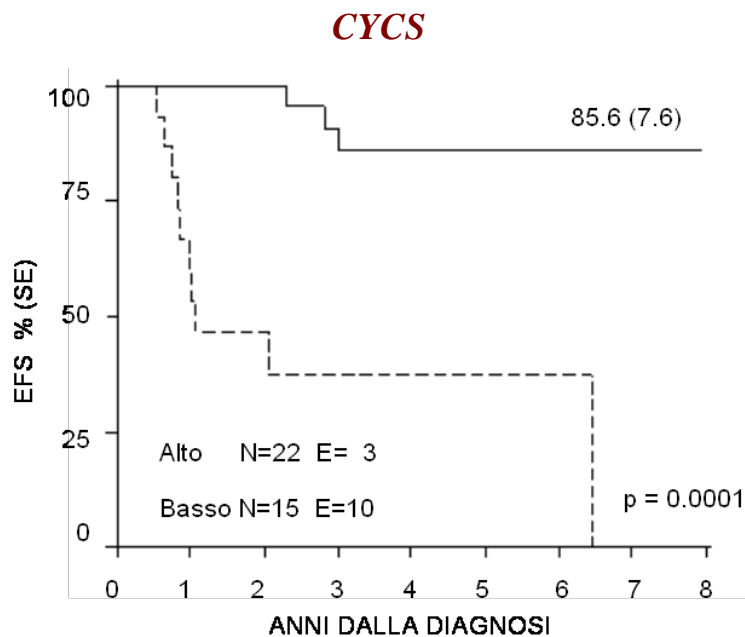


Figura 12. EFS relativa a *CYCS*

L'analisi di associazione eseguita mediante test di Fisher è risultata positiva per queste 2 variabili (*CASP3* e *CYCS*) (Tabella 9). Abbiamo pertanto analizzato le combinazioni possibili di questa associazione al fine di definire meglio il loro ruolo sull'impatto prognostico nella nostra coorte di pazienti pediatrici (Figura 13-14-15).

Lo studio delle possibili combinazioni dei livelli di espressione di questi 2 geni (*CASP3* e *CYCS*) ha consentito di evidenziare, nella nostra coorte di pazienti pediatriche affetti da LH, l'esistenza di 3 gruppi di rischio che correlano significativamente con l'EFS:

- alto rischio che comprende pazienti nei quali entrambi i geni *CASP3* e *CYCS* risultano essere down regolati
- rischio intermedio con EFS a 5 aa del 58.95% (SE 16) che comprende pazienti nei quali è presente la down regolazione di uno solo dei 2 geni
- basso rischio con EFS a 5 aa del 94.1% (SE 5.7) che comprende pazienti nei quali l'espressione di entrambi i geni risulta essere up regolata (Figura 15).

casp3	cyCS		Total
	alto	basso	
alto	17 73.91 77.27	6 26.09 40.00	23 100.00 62.16
basso	5 35.71 22.73	9 64.29 60.00	14 100.00 37.84
Total	22 59.46 100.00	15 40.54 100.00	37 100.00 100.00

Fisher's exact = **0.038**

Tabella 9. Analisi di associazione mediante test di Fisher di *CASP3/CYCS*

CASP3 + CYCS

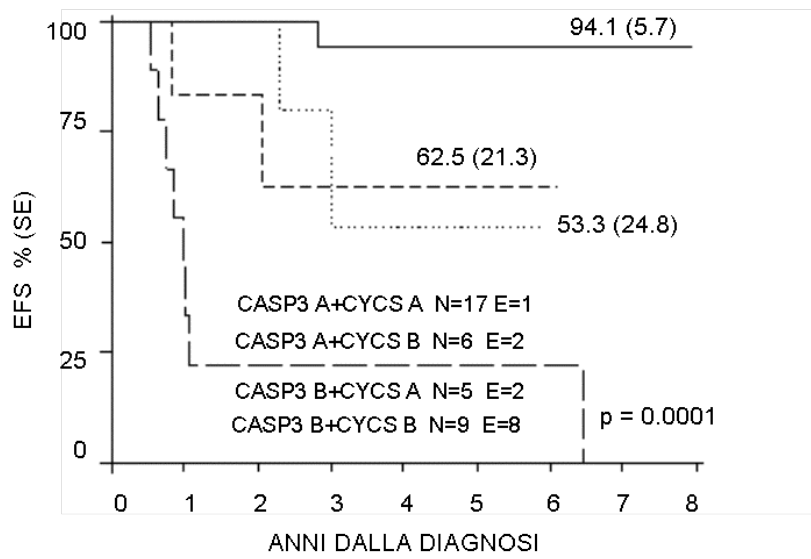
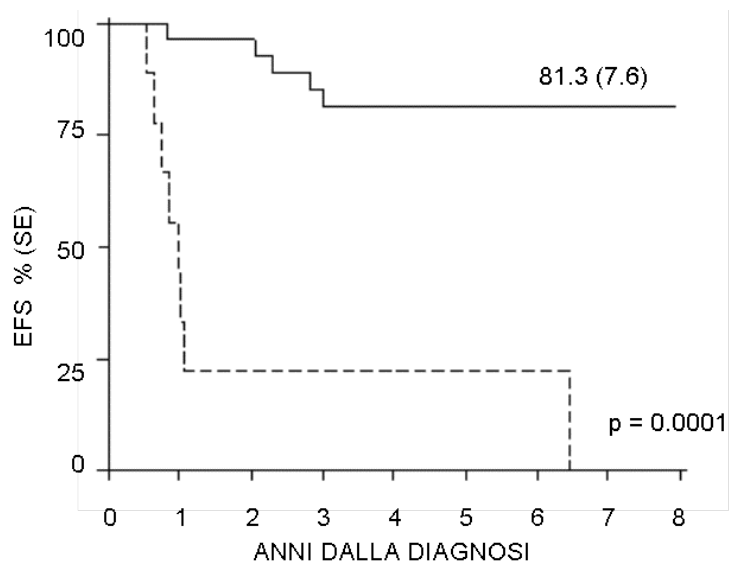


Figura 13. EFS relativa alla combinazione *CASP3/CYCS*
 A: livello di espressione alto; B livello di espressione basso

CASP3 + CYCS



CASP3 A+CYCS A /CASP3 B+CYCS A/CASP3 A+CYCS B N=28 E=5
 CASP3 B+CYCS B N=9 E=8

Figura 14. EFS relativa alla combinazione *CASP3/CYCS*
 A: livello di espressione alto; B livello di espressione basso

CASP3 + CYCS

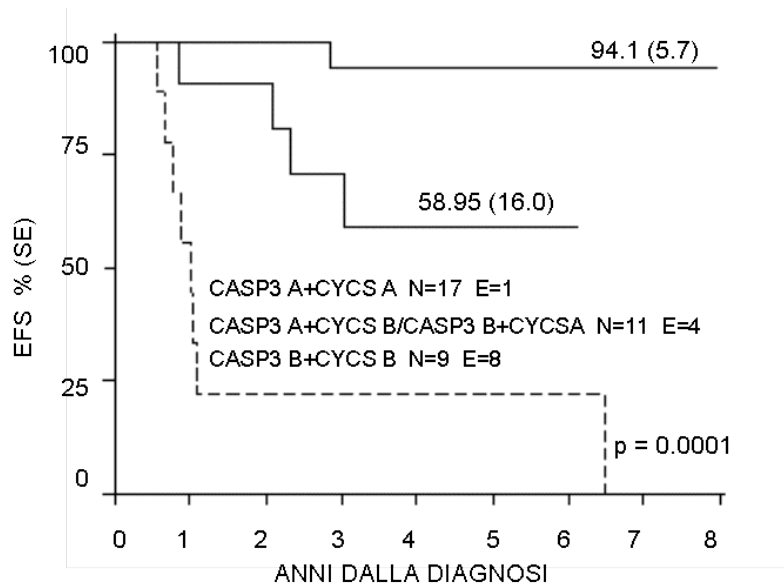


Figura 15. EFS relativa alla combinazione *CASP3/CYCS*
A: livello di espressione alto; **B** livello di espressione basso

È stata successivamente eseguita un'analisi multivariata sulle uniche 2 variabili risultate statisticamente significative in univariata. Da tale analisi si è evidenziato che l'espressione di *CASP3* rappresenta l'unica variabile che, anche in multivariata, mantiene la sua indipendenza nell'influenzare la prognosi con un rischio di eventi di oltre il doppio di chi ha un'espressione bassa rispetto a chi ha un'espressione alta di questo gene (Tabella 10)

Cox regression model

efstg	Haz. Ratio	Std. Err.	z	P> z	[95% Conf. Interval]
cl_casp3	2.351831	.8935107	2.25	0.024	1.116906 4.952172
cl_cycs	2.071508	.7773284	1.94	0.052	.9928309 4.322131

Tabella 10. Analisi multivariata di *CASP3* e *CYCS*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Data la significatività statistica dei risultati di espressione ottenuti su 2 dei 27 geni analizzati (*CASP 3* e *CYCS*), abbiamo tentato di interpretare il dato di espressione genica anche mediante revisione della letteratura.

CASP 3 e *CYCS* fanno parte dei due pathway molecolari in grado di indurre in apoptosi una cellula:

1. la via estrinseca: controllata dai recettori di morte appartenenti alla famiglia del recettore del TNF presenti sulla membrana cellulare come ad esempio CD95-R (Fas)
2. la via intrinseca: passa per il mitocondrio che gioca un ruolo centrale nella morte cellulare in risposta al danno a carico del DNA o di stress intracellulari, e che è mediata dalle proteine appartenenti alla famiglia di Bcl-2.

Con il rilascio di citocromo C la via estrinseca di apoptosi è coadiuvata dalla via intrinseca che vede nel rilascio del citocromo l'evento chiave di innesco (Figura 16)

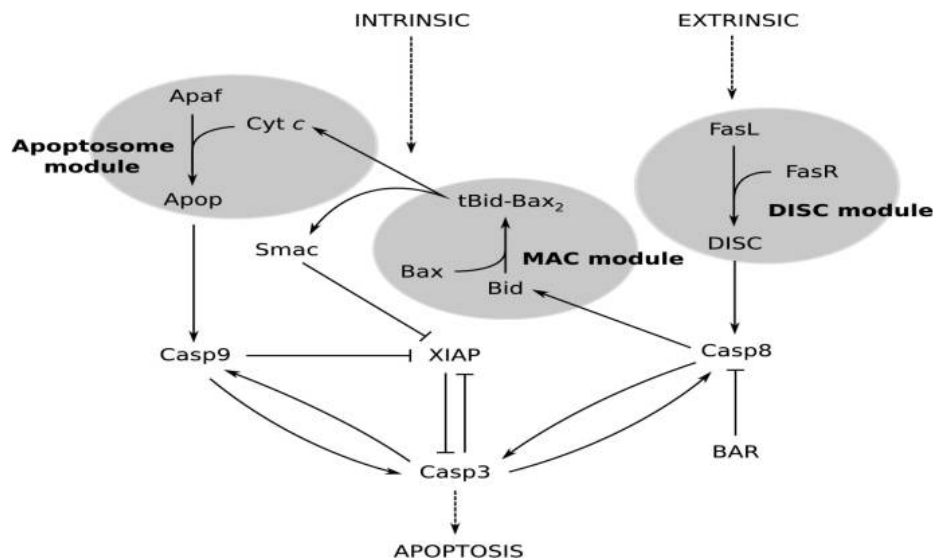


Figura 16. Via intrinseca ed estrinseca di induzione dell'apoptosi

Analogamente a quanto già ampiamente descritto in letteratura, un difetto dell'induzione dell'apoptosi successivo ad una carente espressione di *CASP3* e *CYCS*, sembrerebbe in grado di indurre un vantaggio proliferativo nella popolazione pediatrica affetta da LH ad outcome sfavorevole.

È ormai dimostrato che le cellule di RS sono caratterizzate da anomalie di espressione di numerosi geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e dei processi apoptotici, tra cui una anomala espressione di NF-kappa B (un fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione della proliferazione cellulare, della risposta immune, dell'apoptosi e dell'infiammazione), presumibilmente legata alla deregolazione dell'interazione con l'inibitore I-kappa-B-alfa (41).

E' noto inoltre come nelle cellule di RS sia coinvolto il *pathway* del gene p53, con accumulo abnorme della proteina nei nuclei delle cellule di RS (44). Tale accumulo può essere legato a diversi meccanismi, tra i quali il legame a molecole stabilizzanti la p53 (mdm2, prodotti virali), di solito inattivanti la funzione transattivante della proteina. Nella maggior parte dei casi di LH classico, si osserva infatti, intensa espressione nucleare di mdm2, una molecola deputata alla regolazione dei livelli di p53 (45) L'iperespressione di mdm2, suggerisce il suo possibile ruolo nella patogenesi del LH (45)(46).

A causa di tali anomalie è possibile ipotizzare che la cellula di RS, una cellula B funzionalmente inefficace, sia sospesa tra proliferazione ed apoptosi (42), in una "cronica" condizione di attivazione (le cellule di RS esprimono elevati livelli di CD25)(43). Questo stato funzionalmente "congelato" delle cellule di RS è presumibilmente responsabile della loro anomala capacità di produrre elevate quantità di mediatori che, interferendo con i meccanismi fisiologici che regolano le risposte infiammatorie ed immuni, inducono le alterazioni microambientali che caratterizzano i tessuti linfoidi coinvolti dalla malattia.

È stato inoltre dimostrato che la deregolazione del pathway apoptotico nelle cellule tumorali del LH è una condizione associata all'entità e alla tipologia dell'infiltrato ad attività citotossica del microambiente reattivo. In un lavoro pubblicato su *Clinical Cancer Reserch* nel 2008 (36), è stato infatti dimostrato, che una alta incidenza di infiltrati cellulari ad attività citotossica nel LH (linfociti T CD8 (+), natural killer CD57 (+) e cellule granzyme B+), risulta essere associata ad una down regolazione di proteine coinvolte nel patwhay apoptotico (tra le quali Casp3 e Bcl-X (L)) nelle cellule del LH.

Inoltre l'entità e la tipologia dell'infiltrato ad attività citotossica nel microambiente reattivo è stato dimostrato correlare con l'outcome (37)(38)(39), e in particolar modo si è osservato che un'alta prevalenza di linfociti T ad azione citotossica nel LH (cellule granzyme B+) correla con una prognosi sfavorevole (38) e che la contemporanea associazione di alta incidenza di linfociti T ad azione citotossici (granzyme B+ and TIA-1) e ridotta presenza di marcatori di regolazione dei linfociti T citotossici (FOXP3) nel background reattivo del LH rappresentano il meccanismo alla base dell'inibizione della risposta immune antitumorale in questi pazienti (37)(Figura 16). Tali marcatori

(granzyme B, TIA-1 e FOXP3) sono infatti stati proposti come marcatori biologici predittivi di cattiva prognosi nei pazienti affetti da LH (37)

Tale dato, oltre a supportare il risultato di espressione genica da noi ottenuto (down regolazione di *CASP 3* e *CYCS* nei pazienti pediatrici con LH ad outcome sfavorevole), conferma l'esistenza di una stretta correlazione causale tra microambiente reattivo (costituito da cellule B e T, macrofagi e cellule infiammatorie) e alterazione dei pathway apoptotico/proliferativo nelle cellule del LH. Negli ultimi anni si va svelando proprio come alla base dei meccanismi patogenetici della malattia ci sia proprio la complessità delle interazioni che intercorrono tra le cellule atipiche di RS e le cellule infiammatorie richiamate ed attivate nei tessuti coinvolti dalla malattia.

L'ipotesi da noi formulata sul meccanismo molecolare a sostegno del dato di espressione genica ottenuto è che nei pazienti ad outcome sfavorevole la popolazione tumorale costituita dalle cellule di RS ottenga un vantaggio proliferativo che si esprime con la down regolazione dell'espressione di alcuni geni coinvolti nel pathway apoptotico (*CASP3* e *CYCS*). Tale vantaggio proliferativo potrebbe in parte essere spiegato con l'inattivazione della componente citotossica del microambiente reattivo da parte della cellula di RS. La down regolazione dell'espressione di *CASP3* e *CYCS* nella cellula di RS potrebbe infatti inibire uno dei meccanismi effettori dei linfociti T citotossici nel microambiente reattivo rappresentato dalla produzione di citochine "proapoptotiche" quali IFN-gamma, TNF- α , TRAIL e Fas-L che inducono l'attivazione della via di morte cellulare nella cellula tumorale mediante attivazione della cascata delle caspasi (Figura 17)

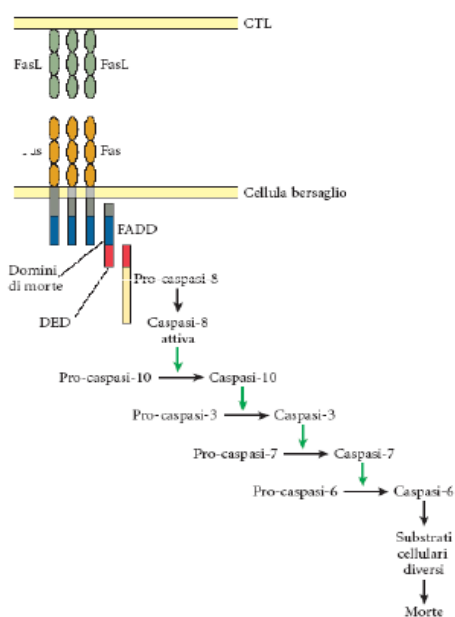


Figura 17. Meccanismi effettori dei linfociti T CD8+ citotossici

Questo meccanismo di evasione della risposta immune, insieme agli altri già conosciuti quali la produzione di TGF- β , IL-4 e IL-10, citochine ad azione immunosoppressiva, da parte delle cellule di RS e di alcune popolazioni reattive, e la mancata espressione degli antigeni MHC di classe I da parte delle cellule di RS, potrebbe in parte spiegare l'impatto prognostico del dato di espressione da noi ottenuto.

Inoltre poiché la componente neoplastica pura rappresentata dalle cellule di RS rappresenta solo una piccola parte della più numerosa componente reattiva mononucleata del microambiente tumorale del LH, è ipotizzabile che il dato di espressione da noi ottenuto (down regolazione di *CASP3* e *CYCS* nei pazienti ad outcome sfavorevole) non sia solo da attribuire alla componente tumorale (cellule di RS), ma rifletta differenze nella tipologia e nell'entità dell'infiltrato cellulare che si ritrovano nelle popolazione di pazienti a prognosi diversa. Partendo dall'evidenza per cui un'alta prevalenza di linfociti T ad azione citotossica nel LH correla con una cattiva prognosi (19) è possibile ipotizzare che la down regolazione dei geni coinvolti nel pathway apoptotico (tra i quali *CASP3* e *CYCS*) non riguardi solo la cellula tumorale di RS, ma sia anche alla base della elevata proliferazione della componente citotossica inefficace che si ritrova nelle forme di LH a prognosi sfavorevole.

In conclusione, i risultati ottenuti sulla nostra coorte di pazienti pediatriche affette da LH confermano l'impatto sulla prognosi di due marcatori molecolari *CASP3* e *CYCS* coinvolti nel pathway di attivazione apoptotica.

La valutazione del livello di espressione di questi 2 geni ha consentito, nel nostro studio, la definizione di 3 categorie di pazienti con EFS differenti. In particolar modo nella nostra coorte di pazienti pediatriche affette da LH, la down regolazione di entrambi i geni è risultata essere una variabile con importante potere impattante negativo sulla prognosi di questi pazienti riducendo l'EFS in modo statisticamente significativo. È quindi ipotizzabile una loro azione sinergica nel meccanismo patogenetico alla base del vantaggio proliferativo caratteristico dei pazienti a prognosi sfavorevole. La down regolazione di uno solo dei 2 geni impatta sulla prognosi, ma in modo meno significativo consentendo la definizione di una categoria di pazienti a rischio intermedio (EFS a 5 aa 58.9%). L'up regolazione di entrambi i geni consente invece nel nostro studio, l'identificazione di una popolazione a basso rischio di evento caratterizzata da una EFS a 5 aa del 94.1%.

La valutazione del profilo di espressione di tali marcatori molecolari ed in particolar modo di *CASP3*, che nel nostro studio è risultato la sola variabile che anche in analisi multivariata ha mantenuto la sua indipendenza nell'influenzare la prognosi, potrebbe pertanto essere utilizzata in

corso di stadiazione, come criterio di predittività di cattiva prognosi nei pazienti pediatrici affetti da LH consentendo di identificare quella categoria di pazienti che ancora oggi non risponde ai trattamenti e muore per recidiva o progressione di malattia e che potrebbe pertanto giovare di un trattamento modificato o intensificato.

BIBLIOGRAFIA

1. Smolewski P., Robak T., Krykowsky E. et al. "Prognostic factors in Hodgkin's disease: multivariate analysis of 327 patients from a single Institution" *Clinical Cancer Research* 6: 1150-1160, 2000.
2. Naresh KN, O'Connor GT, Chitralakha S. Soman et al. "A Study of p53 protein, proliferating cell nuclear antigen, and p21 in Hodgkin's disease at presentation and relapse" *Human Pathology* 28, n^o 5: 549-555 May 1997
3. Sánchez-Espiridión B et al. "A TaqMan low-density array to predict outcome in advanced Hodgkin's lymphoma using paraffin-embedded samples." *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 15; 15 (4) :1367-75.
4. Rassidakis GZ et al: "BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens" *Blood.* 2002 Dec 1;100(12):3935-41
5. Alvaro T et al. "Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells." *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 15;11(4):1467-73.)
6. Smolewski P, Niewiadomska H, Los E, Robak T et al. "Spontaneous apoptosis of Reed-Sternberg and Hodgkin cells; clinical and pathological implications in patients with Hodgkin's disease" *Int J Oncol.* 2000;17(3):603-9.
7. Brink AA, Oudejans JJ, van den Brule AJ et al. "Low p53 and high bcl-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome for Hodgkin's disease: involvement of apoptosis resistance" *Mod Pathol.* 1998;11(4):376-83.
8. Pagnano KB, Vassallo J, Lorand-Metze I et al "p53, Mdm2, and c-Myc overexpression is associated with a poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphomas" *Am J Hematol.* 2001;67(2):84-92.
9. Nieder C, Petersen S, Petersen C et al "The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma" *Ann Hematol.* 2001;80(1):2-8.
10. Parkin DM, *IARC Scientific Publications*, p. 120, 1992
11. Jarrett RF et al., *Ann Oncol* 7(Suppl. 4): S5-S10, 1996
12. Niedobitek G et al., *Ann Oncol* 7 (Suppl. 4): S11-S17, 1996
13. Weiss LM et al., *Adv Anatomic Pathol* 3: 1-15, 1996

14. Jaffe ES et al "The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research" *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;523-31. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.523
15. Harris NL et al. "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group" *Blood* 84: 1361-1392, 1994
16. Mason DY et al. "Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. A distinct clinicopathological entity" *Am J Surg Pathol* 18: 526-530, 1994
17. Harris NL et al., "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group". *Blood* 84: 1361-1392, 1994
18. Chilos M et al. "Abnormal expression of the p53-binding protein MDM2 in Hodgkin's disease" *Blood*. 1994;84(12):4295-300
19. Kraus MD et al "Lymphocyte predominance Hodgkin's disease: the use of bcl-6 and CD57 in diagnosis and differential diagnosis" *Am J Surg Pathol*. 2000;24(8):1068-78.
20. Izban KF et al "Characterization of the interleukin-1beta-converting enzyme/ced-3-family protease, caspase-3/ CPP32, in Hodgkin's disease: lack of caspase-3 expression in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease" *Am J Pathol*. 1999;154(5):1439-47.
21. Jaffe ES et al "Anaplastic large cell lymphoma: the shifting sands of diagnostic hematopathology" *Mod Pathol*. 2001 ;14(3):219-28. Review.
22. Kanavaros P et al "Cytotoxic protein expression in non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease" *Anticancer Res*. 1999;19(2A):1209-16.
23. Seitz V, Hummel M, Anagnostopoulos I et al "Analysis of BCL-6 mutations in classic Hodgkin disease of the B- and T-cell type" *Blood*. 2001;97(8):2401-5.
24. Foss HD, Reusch R, Demel G et al ".Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin" *Blood*. 1999;94(9):3108-13.
25. Gruss HJ et al., *Immunol Today* 1997, in press
26. Gruss HJ et al., *Ann Oncol* 7 (Suppl. 4): S19-S26, 1996
27. Gruss HJ et al., *Crit Rev Oncogen* 5: 473-538, 1994
28. Gruss HJ et al., "Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas" *Blood* 85: 3378-3404, 1995
29. Carbone et al., "Expression of functional CD40 antigen on Reed-Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines" *Blood* 85: 780-789, 1995
30. Lister TA et al., "Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting." *J Clin Oncol* 7: 1630-1636, 1989

31. Rosenberg SA, "The management of Hodgkin's disease: half a century of change. The Kaplan Memorial Lecture" *Ann Oncol* 7: 555-560, 1996
32. Eric D. Hsi et al. "MAL Is Expressed in a Subset of Hodgkin Lymphoma and Identifies a Population of Patients With Poor Prognosis" *Am J Clin Pathol* 2006;125:776-782
33. Christian Steidl et al. "Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome" *Blood*. 2010;116(3): 418-42
34. Sánchez-Espiridión B et al. "A molecular risk score based on 4 functional pathways for advanced classical Hodgkin lymphoma" *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):e12-7
35. Steidi C et al "Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma" *N Engl J Med*. 2010; 362(10): 875–885
36. Alvaro T et al. "Tumor-infiltrated immune response correlates with alterations in the apoptotic and cell cycle pathways in Hodgkin and Reed-Sternberg cells" *Clin Cancer Res* 2008;685 14(3): 685-91
37. Alvaro T et al. "Outcome in Hodgkin's Lymphoma Can Be Predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells" *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1467-73
38. Oudejans JJ et al. "Activated Cytotoxic T Cells as Prognostic Marker in Hodgkin's Disease" *Blood*. 1997 Feb 15;89(4):1376-82
39. Alvaro T et al."Tumor-infiltrating cells as a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients." *Leuk Lymphoma*. 2005 Nov;46(11):1581-91
40. Steidl C, et al "Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma" *N Engl J Med*. 2010 Mar 11;362(10):875-85
41. Emmerich F, Meiser M, Hummel M et al."Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells" *Blood*. 1999;94(9):3129-34.
42. Raaphorst FM et al "Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease". *Am J Pathol*. 2000;157(3):709-15.
43. Pizzolo G, Chilosi M, Semenzato G et al "Immunohistological analysis of Tac antigen expression in tissues involved by Hodgkin's disease" *Br J Cancer*. 1984 ;50(3):415-7
44. Doglioni C, Pelosio P, Mombello A et al "Immunohistochemical evidence of abnormal expression of the antioncogene-encoded p53 phosphoprotein in Hodgkin's disease and CD30+ anaplastic lymphomas." *Hematol Pathol*. 1991;5(2):67-73.

45. Chilosì M, Doglioni C, Menestrina F et al "Abnormal expression of the p53-binding protein MDM2 in Hodgkin's disease". *Blood*. 1994;84(12):4295-300.
46. Kupper M, Joos S, von Bonin F et al."MDM2 gene amplification and lack of p53 point mutations in Hodgkin and Reed-Sternberg cells: results from single-cell polymerase chain reaction and molecular cytogenetic studies." *Br J Haematol*. 2001;112(3):768-75.
47. Marafioti T, Hummel M, Foss HD et al "Hodgkin and reed-sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangements but defective immunoglobulin transcription." *Blood*. 2000;95(4):1443-50.
48. Foss HD, Reusch R, Demel G et al. "Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin" *Blood*. 1999;94(9):3108-13.
49. Teruya-Feldstein J, Jaffe ES, Burd PR et al."Differential chemokine expression in tissues involved by Hodgkin's disease: direct correlation of eotaxin expression and tissue eosinophilia" *Blood*. 1999;93(8):2463-70
50. Kaplan EL, Meier P. Nonparametral estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*. 1958;53:457.
51. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports* 1966; 50:163-170.
52. Cox DR. Regression models and life tables (with discussion). *J Royal Stat Soc B*. 1972;34:187.