

*Alma Mater Studiorum  
Università degli Studi di Bologna*

---

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
ONCOLOGIA E PATOLOGIA SPERIMENTALE  
COORDINATORE: Chiar.mo Prof. Sandro Grilli**

**LA SUSCETTIBILITA' GENETICA AL LINFOMA DI  
HODGKIN E AI TUMORI SECONDARI:  
DUE STORIE O DUE CAPITOLI DELLA STESSA  
STORIA?**

Presentata dalla Dott.ssa  
Elisa Zuffa

Tutore  
Chiar.ma Prof.ssa Enza Barbieri

---

Anno Accademico 2006-2007  
XX CICLO

# INDICE

<b>1-INTRODUZIONE</b>	<b>PAG. 1</b>
1.1 L'instabilità genomica.....	1
1.1.1 Riparazione degli accoppiamenti errati (MMR).....	2
1.1.2 Riparazione per escissione nucleotidica.....	4
1.1.3 Riparazione delle rotture a doppio filamento (HR e NHEJ).....	5
1.2 Ontogenesi dei Linfociti B.....	10
1.2.1 Riarrangiamento V(D)J.....	10
1.3 I Linfomi non Hodgkin .....	16
1.3.1 Clinica e terapia del LH.....	16
1.3.2 Origine della cellula di Reed-Sternberg.....	24
1.4 Instabilità genomica nel Linfoma di Hodgkin .....	25
1.4.1 LH familiari e fenomeno dell'anticipazione.....	26
1.4.2 Correlazione con un aplotipo HLA sfavorevole.....	26
1.4.3 Evidenze a favore dell'instabilità genomica nel LH.....	27
1.4.4 Alta percentuale di neoplasie in seguito ai trattamenti terapeutici.....	29
<b>2- SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>31</b>
<b>3-MATERIALI E METODI.....</b>	<b>32</b>
3.1 Materiali .....	32
3.2 Metodi .....	33
3.2.1 Estrazione del DNA .....	33
3.2.2 DOP-PCR .....	33
3.2.3 CGH Microarray .....	35
3.2.4 FISH.....	37
3.2.5 Immunoistochimica .....	38

3.2.6	Microdissezione laser.....	39
3.2.7	Analisi di clonalità.....	39
<b>4-</b>	<b>RISULTATI.....</b>	<b>41</b>
4.1	Studio dei pazienti che hanno sviluppato una LAM come tumore secondario .....	41
4.1.1	I casi clinici.....	41
4.1.2	Esperimenti di CGH microarray.....	45
4.1.3	Validazione dei risultati di CGH microarray.....	57
4.2	Studio dei pazienti che hanno sviluppato un LNH come tumore secondario .....	61
4.2.1	I casi clinici.....	61
4.2.2	Esperimenti di CGH microarray.....	64
4.2.3	Validazione dei risultati di CGH microarray.....	69
4.2.4	Analisi di clonalità.....	71
<b>5-</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>77</b>
<b>6-</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>89</b>

# INTRODUZIONE

## 1. L'INSTABILITA' GENOMICA

L'integrità genomica della cellula è una caratteristica fondamentale nell'evoluzione e deve essere salvaguardata al fine di garantire una corretta trasmissione dell'informazione genetica. Difetti della DNA riparazione sono considerati coinvolti nell'oncogenesi e nella progressione del cancro (fig.1).

Esiste un complesso network che, in condizioni normali, provvede a riconoscere e riparare i danni subiti dal DNA, sia che si tratti di modificazioni chimiche che di alterazioni fisiche della doppia elica. In termini generali, i siti in cui si è verificato un danno al DNA vengono riconosciuti da nucleasi che rimuovono per escissione la regione danneggiata e in seguito altri enzimi (polimerasi) operano la sintesi di sequenze sostitutive corrette che vengono inserite mediante il processo di ligazione; si tratta dunque di un sistema complesso di fattori che nell'uomo coinvolge circa 130 geni diversi.

Un danno al DNA può essere riparato da diversi meccanismi:

- Riparazione degli accoppiamenti errati (mismatch repair), che avviene immediatamente dopo la sintesi del DNA e sfrutta il filamento parentale intatto come stampo
- Riparazione per escissione con conseguente rimozione di una regione danneggiata e sintesi di un nuovo segmento di DNA
- Riparazione delle interruzioni nel doppio filamento di DNA mediante il ricongiungimento delle estremità interrotte (1).

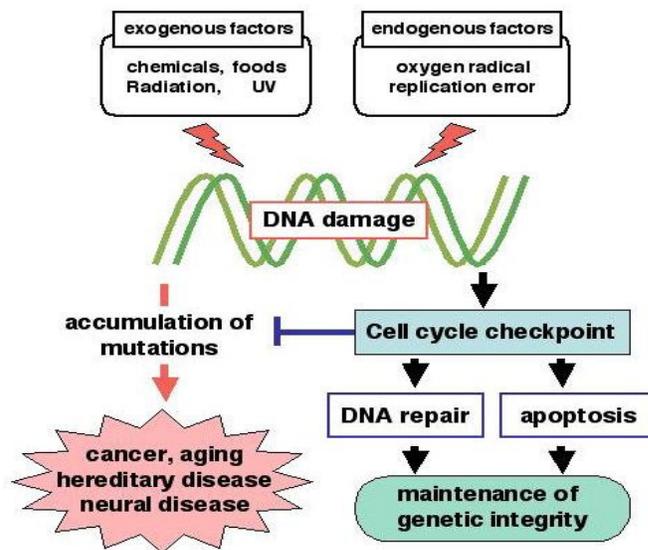


Fig.1 Risposta al danno al DNA

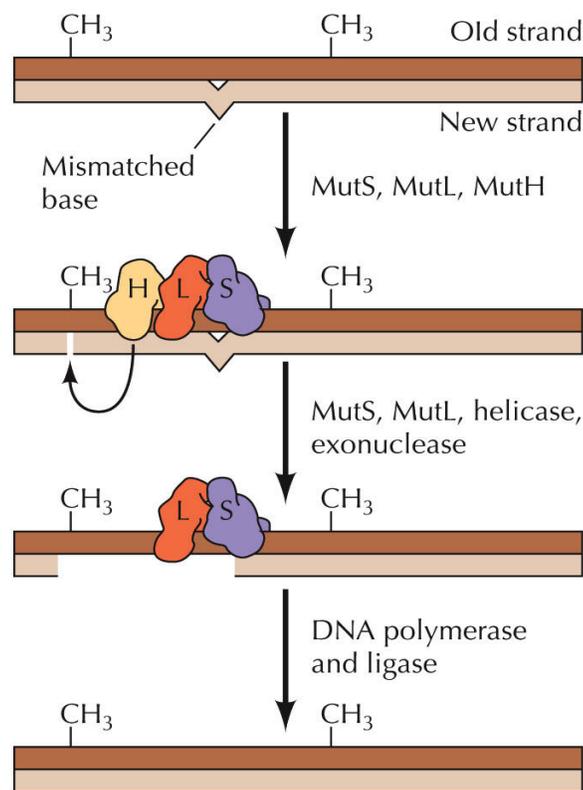
### 1.1 Riparazione degli accoppiamenti errati (MMR)

Molte mutazioni spontanee o indotte da agenti genotossici sono mutazioni puntiformi, che comportano un cambiamento in una singola coppia di basi della sequenza del DNA. Queste possono derivare da errori durante la replicazione, durante la ricombinazione genica, ma soprattutto in conseguenza della deaminazione delle basi che converte un residuo di C in U.

Il problema principale alla base della riparazione degli accoppiamenti errati è riuscire a stabilire quale dei due filamenti di DNA sia quello normale e quale il mutato che deve essere riparato. Il primo passo è il riconoscimento del sito, che avviene tramite un paio di complessi proteici denominati nel complesso MutS ( $\alpha$  e  $\beta$ ). Le cellule con alterazioni a carico di tali geni hanno un tasso di mutazioni spontanee più alto rispetto alle cellule normali e questo sembra essere alla base di una forma di cancro coloretale familiare non poliposico (HNPCC).

Da molti studi sembra che MutS $\alpha$ /MutS $\beta$  sia in grado di riconoscere delle rotture a singolo filamento (SSB) che si formano durante la replicazione e che indicano il filamento copia. Quindi, dopo aver riconosciuto un appaiamento errato tra le basi,

queste proteine scrono lungo il filamento alla ricerca di un SSB, attraverso un meccanismo ATP-dipendente. Il legame di MutS nel sito richiama MutL, un altro complesso eterodimerico capace di connettere MutS a MutH. Quest'ultima è in grado di tagliare in modo specifico il filamento neosintetizzato (non metilato). A seguito di questa iniziale incisione, il filamento che contiene la base incorporata erroneamente viene reciso ad opera dell'esonucleasi 1 e l'azione della DNApol $\delta$  e della ligasi provvedono alla sostituzione con la sequenza di DNA corretta (fig.2)(2).



THE CELL, Fourth Edition, Figure 6.24 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Fig.2 Riparazione degli accoppiamenti errati (MMR).

### 1.2 Riparazione per escissione nucleotidica (NER).

Le cellule sfruttano il meccanismo di riparazione per escissione per riparare regioni del DNA che contengono basi chimicamente modificate (addotti), che distorcono

localmente la normale conformazione del DNA. Per esempio, questo sistema di riparazione serve a correggere i dimeri timina-timina causati dalle radiazioni UV. Durante la NER (Nucleotide Excission Repair) sono coinvolte ben trenta proteine, alterazioni delle quali portano a malattie come lo Xeroderma Pigmentosum e la Sindrome di Cockayne.

Si distinguono due vie, una di riparazione genomica globale (denominata GGR) e una accoppiata alla trascrizione (TCR). La prima serve per eliminare gli addotti da regioni non trascritte, mentre la TCR rimuove le alterazioni che bloccano la RNA polimerasi impedendo la trascrizione.

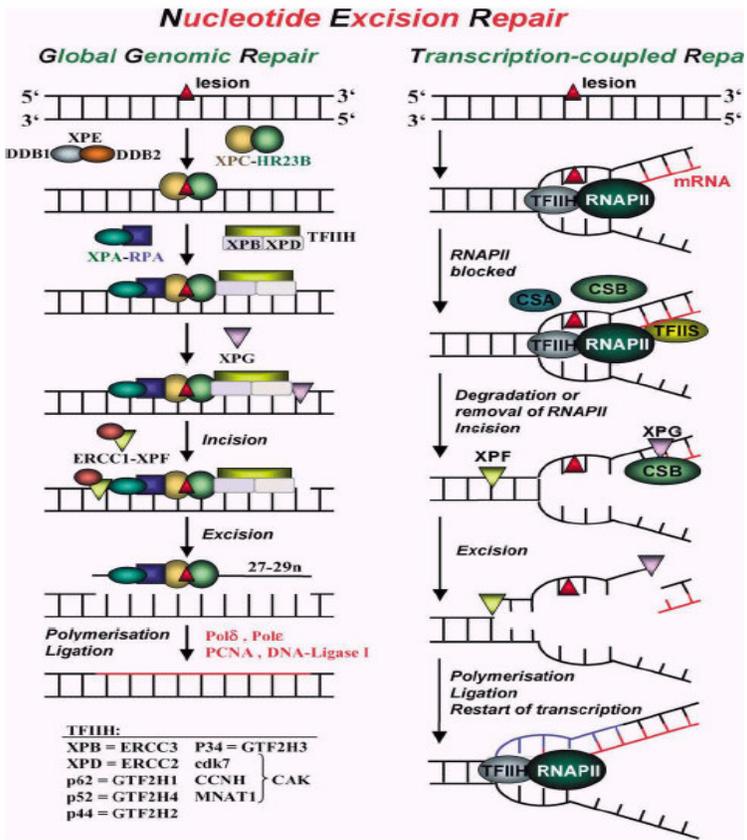


Fig.3 Riparazione per escissione nucleotidica (NER)

Durante la GGR, il riconoscimento della lesione al DNA avviene grazie ai complessi XPC-HR23B, RPA-XPA o DDB1-DDB2. Nel sito viene richiamato il complesso

TFIIH che svolge il DNA circostante e vengono operate delle rotture a singolo filamento sul lato della lesione. Infine la DNAPol $\delta$  o la DNAPol $\epsilon$  sintetizzano il frammento mancante che verrà saldato ad opera della DNA ligasi I (fig. 3).

Nel caso in cui la lesione costituisca un blocco per la RNA polimerasi, si assemblano in situ CSA, CSB e TFIIIS che formano il complesso della riparazione accoppiata alla trascrizione. La RNAPolIII viene spiazzata e il sito diviene accessibile alle esonucleasi XPF-ERCC1 e XPG che tagliano il tratto di DNA con la lesione. Come nel caso della GGR l'intervento delle polimerasi e della ligasi portano alla sintesi di un frammento corretto di DNA (3).

### **1.3 Riparazione delle rotture a doppio filamento (HR e NHEJ)**

Le rotture che colpiscono entrambi i filamenti o Double Strand Breaks (DSB) rappresentano un evento particolarmente drammatico per la cellula, come il danno radio-indotto. Esse possono essere riparate solo se le estremità libere del DNA sono ricongiunte esattamente. Questo processo di riparazione è reso particolarmente difficile dall'assenza di regioni a singolo filamento che possano dirigere l'appaiamento delle basi durante il processo di unione. Uno dei due meccanismi sviluppatisi per riparare i DSB è la ricombinazione tra omologhi (HR); in questo processo si sfruttano le informazioni presenti sul cromosoma omologo intatto per riparare quello danneggiato: in questo tipo di riparo, un trimero composto dalle proteine MRE11–Rad50–NBS1 opera una digestione del DNA in direzione 5'-3' lasciando un singolo filamento parziale al 3'. Vi si legano Rad52 ed RPA, che attirano il complesso del Rad51, che ed effettua la ricombinazione fra i filamenti. Infine avviene la sintesi del nuovo DNA e la sua ligazione per ripristinare la sequenza corretta (fig.4) (4).

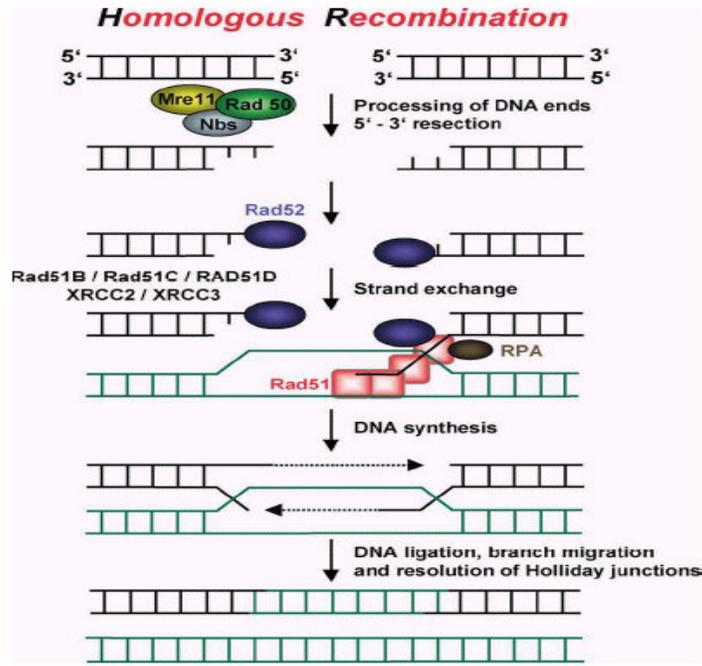


Fig.4 Processo di riparazione mediante ricombinazione tra omologhi (HR).

Spesso però il meccanismo di riparazione prevalente per i tagli a doppio filamento prevede la giunzione delle estremità tra due qualsiasi molecole di DNA tramite un processo di ricombinazione non omologa (NHEJ).

In questo meccanismo il primo passo è l'attacco nel punto di rottura del complesso Ku70-Ku80, per difendere il DNA dall'azione delle esonucleasi. A queste due proteine si lega DNA-Pk andando a formare il complesso attivo DNA-Pk<sub>CS</sub>. Questo forma infine un trimero con l'intervento del fattore Artemis che, una volta fosforilato, svolge un'azione nucleolitica, tagliando il tratto di DNA danneggiato.

Infine vengono richiamati nel sito i complessi XRCC4-ligasi IV, che riuniscono i due filamenti precedentemente processati da MRE11-Rad50-NBS1.

Questo sistema riesce a ripristinare l'integrità di una molecola a doppio filamento, ma come conseguenza porta alla perdita (delezione) di diverse coppie di basi in corrispondenza del punto d'unione. (fig. 5)

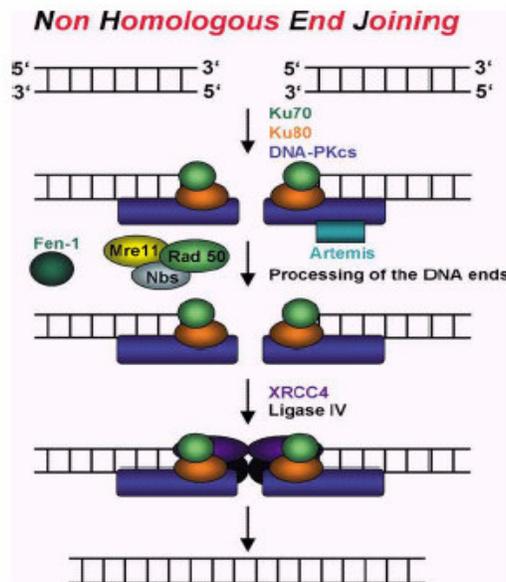


Fig.5 Processo di riparazione per ricombinazione fra filamenti non omologhi (NHEJ).

È importante sottolineare che una cellula che ha subito una rottura in entrambi i filamenti di DNA in una data sede, generalmente contiene anche altri punti di rottura. Qualora il ricongiungimento avvenga fra estremità di cromosomi differenti, si verifica una traslocazione di frammenti di DNA da un cromosoma all'altro. Queste traslocazioni possono posizionare oncogeni vicino a promotori di altri geni che, di conseguenza, esercitano un controllo inappropriato e, nel caso appartengano a geni costitutivamente espressi, possono provocare un'anomala proliferazione della cellula. Lesioni del doppio filamento sono causate principalmente da radiazioni ionizzanti e da farmaci intercalanti, quali le antracicline. Nel caso di rotture a doppio filamento del DNA si cerca di riparare subito il danno, ma se il danno è troppo esteso o il sistema di riparo non è in grado di ripararlo, occorre attivare un segnale pro-apoptotico.

Alla base di questo meccanismo di risposta vi sono le proteine ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) e ATR (Ataxia Telangiectasia Related), due chinasi appartenenti al gruppo delle fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI-3K).

Esse sono in grado di riconoscere e legare le rotture della doppia elica, attivandosi per autofosforilazione. ATM attivato fa partire una cascata che porta alla fosforilazione e alla conseguente attivazione di Chk1 e Chk2 che a loro volta fosforilano p53 in Ser20, liberandolo da MDM2. Inoltre, sia ATM che ATR sono in grado di attivare direttamente p53 fosforilandolo nel residuo Ser15. L'attivazione di p53, come è noto, comporta il blocco della progressione nel ciclo cellulare allo stadio G1/S finché il danno non è stato riparato; solo a questo punto la cellula potrà entrare nella fase S e duplicare il proprio DNA. Questo arresto nel check-point può essere transitorio per dare alla cellula il tempo necessario per effettuare tutte le riparazioni. Ma se i danni sono troppo estesi o i sistemi di riparazione non sono efficienti la cellula deve prendere la via dell'apoptosi (fig.6).

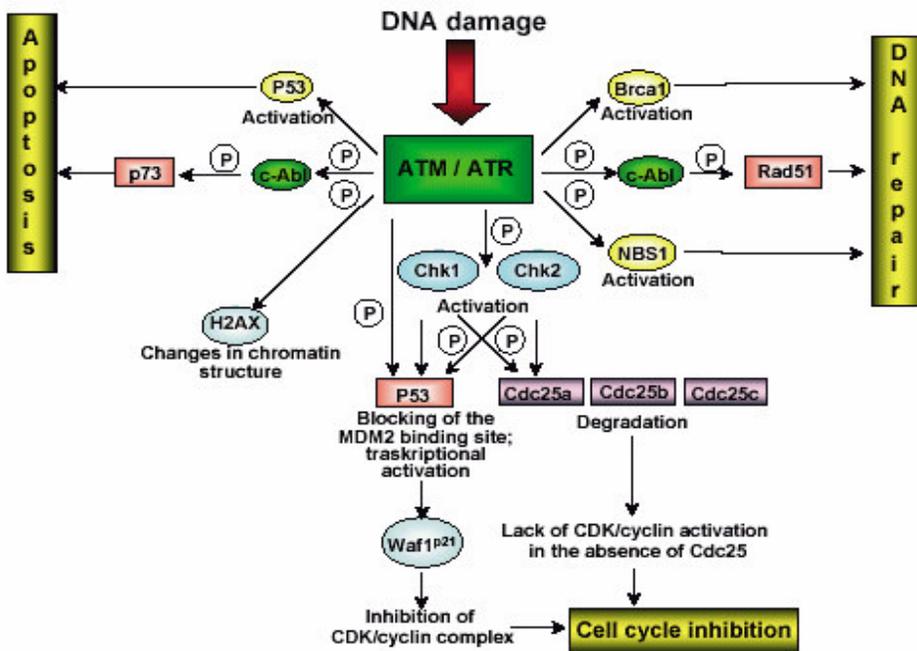


Fig.6 Pathway di segnalazione di ATM/ATR.

L'importanza che rivestono il riconoscimento e la riparazione dei DSBs viene evidenziata dalla gravità delle patologie associate a mutazioni in geni che codificano

per proteine che partecipano alla risposta ai DSBs: mutazioni inattivanti del gene ATM provocano l'Atassia-Teleangectasia (A-T) e mutazioni nel gene NBS1 provocano la Nijmegen Breakage Syndrome (NBS), tutti disordini caratterizzati da instabilità genomica e immunodeficienza, predisposizione allo sviluppo di linfomi con la presenza di traslocazioni cromosomiche.

Nell'uomo mutazioni nel gene che codifica per la Ligasi IV provocano la sindrome LIG4 e mutazioni nella proteina Artemis provocano una sindrome caratterizzata da radiosensibilità e severa immunodeficienza (RS-SCID). Inoltre, poiché i meccanismi di riparo dei DSBs e checkpoint del ciclo cellulare/induzione dell'apoptosi sono complementari, difetti associati di entrambi i meccanismi aumentano drasticamente la predisposizione allo sviluppo di tumori, ad esempio difetti associati di proteine del complesso NHEJ e di p53 predispongono nel topo allo sviluppo di linfomi a cellule pro-B. La maggior parte di questi linfomi sono caratterizzati dalla presenza di una traslocazione fra il cromosoma 12, che contiene il gene per il locus delle IgH, e il cromosoma 15, che contiene il gene c-myc, mentre mutazioni associate di p53/Artemis predispongono allo sviluppo di linfomi a cellule pro-B in cui vengono giustapposti il locus delle IgH con l'oncogene n-Myc, situato sempre sul cromosoma 12, tramite un meccanismo di traslocazione complesso che porta all'amplificazione del prodotto di traslocazione con la generazione di un "complicone". Mutazioni di p53 possono inoltre contribuire allo sviluppo di linfomi facilitando la comparsa e il mantenimento di altre mutazioni oncogeniche, che avvengono spesso durante l'evoluzione maligna tardiva (1,5,6).

## **2. ONTOGENESI DEI LINFOCITI B**

Il percorso evolutivo dei linfociti B si svolge per la maggior parte nel midollo osseo, da cui la 'B' che indica appunto il bone marrow (midollo osseo), e si conclude nei distretti linfatici periferici secondari. A monte dei processi evolutivi dei linfociti, esiste un progenitore staminale comune sia per i linfociti B (LB) e che per i linfociti T (LT). Da questo si diparte il lineage B con le cellule pro-B (7).

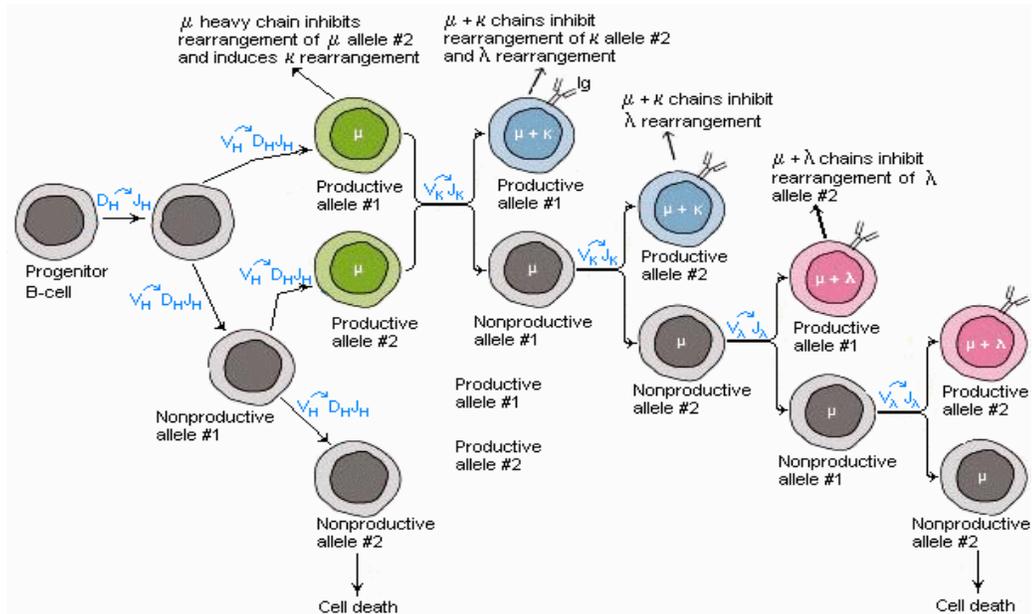


Fig. 7 Schema del differenziamento del lineage B.

Queste non secernono ancora Ig, ma esprimono già molecole di superficie ristrette allo stipite B quali CD10 e CD19. In questo stadio di sviluppo inizia il riarrangiamento dei loci dei geni delle immunoglobuline.

## 2.1 Riarrangiamento V(D)J

Potenzialmente qualunque antigene può indurre una risposta anticorpale e ogni individuo possiede un repertorio anticorpale che può raggiungere anche fino a  $10^{11}$  specificità. Tale repertorio viene generato dalla presenza di un numero elevato (ma

comunque limitato) di geni che subiscono un riarrangiamento e la diversità fra le molecole anticorpali è aumentata grazie a fenomeni di ipermutazione somatica.

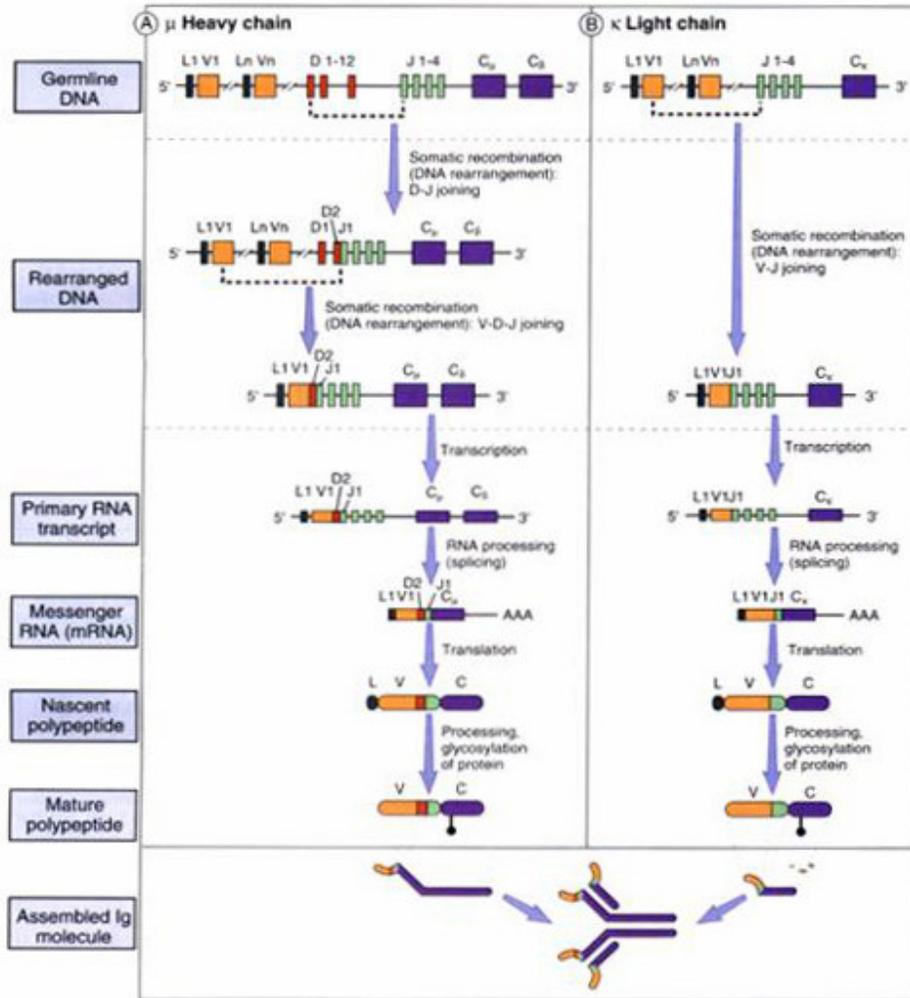


Fig. 8 Schema del riarrangiamento V(D)J

Per questo motivo durante l'evoluzione si è introdotto un modo per assicurare alla specie umana questo enorme ventaglio di possibilità. Nel genoma umano esistono in totale sette loci capaci di andare incontro al riarrangiamento V(D)J, in particolare tre sono deputati alle varie catene delle Immunoglobuline: IgH (catena pesante delle Ig), Ig $\kappa$  e Ig $\lambda$  (le due catene leggere). Questi loci sono formati da due (Ig $\kappa$  e Ig $\lambda$ ) o tre

(IgH) cluster di molti segmenti genici: V (Variable), D (Diversity, solo per la IgH) e J (Junction). In pratica solo un segmento per ogni cluster viene preso in maniera random e fuso assieme agli altri a formare un unico gene, mentre tutto il resto viene perso (fig. 8).

Dietro a questo complesso meccanismo c'è un'altrettanto complessa regolazione, in quanto si tratta di un processo che avviene solo nei linfociti, con una scansione temporale delle varie fasi molto precisa, e che avviene prima su un allele e poi sull'altro. Per questo ultimo aspetto in particolare si tenta il riarrangiamento prima su un dei due loci, se il risultato è fruttuoso si continua su quell'allele, altrimenti tutto il processo viene abortito e si riparte da capo sull'altro cromosoma. Il primo aspetto è quindi la regolazione, che è sia genica, con l'attivazione di tutta una serie di fattori di trascrizione, che cromatinica, con le modificazioni del DNA e degli istoni (8-10). Per quanto riguarda l'acetilazione istonica la regolazione avviene sull'istone H4, fortemente acetilato in prossimità dei promotori e delle Sequenze Segnale della Ricombinasi (Recombinase Signal Sequences, RSS), e a seconda della fase nei segmenti che in quel momento sono sottoposti a ricombinazione. I meccanismi di acetilazione istonica vanno di pari passo con la metilazione e demetilazione del DNA. Questo meccanismo è regolato dagli stessi elementi in cis che regolano anche la ricombinazione, ed assume efficacia e significatività solo quando è associata alla modificazione della struttura cromatinica. Il primo momento di tutto il processo è l'espressione di due particolari ricombinasi, RAG1 e RAG2, specifiche dei linfociti. Mutazioni inattivanti delle proteine RAG1 e RAG2 impediscono nel topo il meccanismo di ricombinazione V(D)J e bloccano quindi lo sviluppo delle cellule B ad uno stadio precoce, mentre nell'uomo sono associate allo sviluppo di patologie caratterizzate da severa immunodeficienza. RAG1 e RAG2 riconoscono le RSS, che sono delle sequenze altamente conservate che fiancheggiano il 3' del segmento V, ambedue le posizioni dell'eventuale segmento D e il 5' del segmento J (11-13). Le RSS sono formate da tre elementi: un eptamero, una sequenza spaziatrice di 12 o 23

bp e un nonamero (quasi solo di adenine). La prima operazione è il taglio a singolo filamento sul DNA a livello dell'ultima base dell'RSS da parte del complesso delle RAG. A questo punto il 3'-OH libero attacca il legame fosfodiesterico del filamento complementare formando una sorta di forcina e chiudendo il filamento, in maniera tale da proteggerlo. Stessa operazione viene effettuata sull'altro segmento da legare, questa volta al 3' del RSS. Intervengono poi le proteine Ku70 e Ku80, che fanno da intermediario per il complesso DNA-PK, deputato al riconoscimento precoce di double-strand breaks (DSBs). Da questo stadio in poi il meccanismo della ricombinazione V(D)J è molto simile al meccanismo di ricombinazione non omologa del DNA (NHEJ): la nucleasi Artemis forma un complesso con DNA-PK ed è responsabile della processazione degli hairpin prima del loro riparo. L'apertura della forcina, da cui si formano delle sequenze palindromiche, viene effettuata nella regione terminale, non in punto preciso. A seguito dell'apertura della forcina le regioni codificanti vengono ulteriormente diversificate, per consentire la grande variabilità dello spettro degli anticorpi che possono essere di conseguenza costruiti, attraverso l'aggiunta di alcune basi al 3' aperto in maniera assolutamente casuale da parte del fattore TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase), oppure attraverso la delezione di alcuni nucleotidi dalla regione codificante. I due segmenti ora devono essere fusi in un unico costrutto, per fare ciò è sufficiente l'appaiamento di 1-3 basi. Le sequenze eventualmente in eccesso che fiancheggiano il sito di giunzione sono digerite o dal complesso RAG o dal fattore Mre11. I vuoti infine sono riempiti dalla DNApol e infine avviene la ligazione ad opera del complesso XRCC4-DNA ligasi IV.

Lo stadio di sviluppo successivo è la cellula pre-B, che presenta nel proprio citoplasma la catena pesante delle Immunoglobuline ( $\mu$ ). Questa forma un complesso, detto recettore pre-B, con una proteina detta catena leggera sostitutiva. Tutta questa struttura è espressa debolmente sulla superficie cellulare in un complesso con  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ . Il complesso catena leggera/ $Ig\alpha/\beta$  serve a stimolare la proliferazione e fa proseguire la maturazione dei linfociti B. Infine si produce una catena leggera,  $\kappa$  o  $\lambda$ ,

che con la catena pesante vanno a formare l'IgM di membrana, in un unico complesso sempre con Ig $\alpha$  ed Ig $\beta$ . Questo stadio di sviluppo viene definito linfocita B immaturo, non ancora in grado di differenziarsi o di proliferare in risposta all'antigene. Se a questo stadio differenziativo la cellula ha un recettore in grado di riconoscere un antigene viene indirizzata verso l'apoptosi. Ciò perché si tratterebbe del riconoscimento di una struttura self, per cui la cellula sarebbe pericolosamente reattiva nei confronti dell'organismo stesso. A questo punto assieme alle catene  $\mu$  si esprimono anche quelle  $\delta$  che portano alla co-espressione in membrana delle IgM e delle IgD. A questo stadio le cellule sono B mature, quindi in grado di reagire agli antigeni. Sono pronte a lasciare il midollo osseo e a dirigersi mediante il flusso sanguigno negli organi linfoidei periferici. In questi siti avviene l'incontro con gli antigeni presentati dalle APC (Antigen Presenting Cells), e i linfociti B, sotto gli stimoli dei LT CD4 helper, danno il via al processo di affinamento degli anticorpi: iniziano a replicarsi e a inserire nei geni delle Ig delle mutazioni casuali, al fine di creare anticorpi il più affini possibili, creando un centro germinativo. Questo affinamento avviene tramite una serie di mutazioni puntiformi clonali random nelle regioni ipervariabili delle immunoglobuline (14).

Linfociti che subiscono difetti durante questo complesso rimaneggiamento genico, se non correttamente eliminati, possono portare all'insorgenza di cloni tumorali, che, appartenendo al tessuto linfoide, prendono il nome di leucemie e linfomi. Una frequente caratteristica delle neoplasie del lineage linfoide è la presenza di traslocazioni cromosomiche, in particolare nei Linfomi di tipo non-Hodgkin e in alcuni tipi di leucemie, che giustappongono un protooncogene ad uno dei loci dei recettori immunoglobulinici, portando alla disregolazione nell'espressione dell'oncogene e quindi all'iniziazione della tumorigenesi.

E' stato quindi ipotizzato che queste traslocazioni oncogeniche siano prodotte da errori durante il processo di maturazione del linfocita non correttamente eliminati dai meccanismi di riparo del DNA o di regolazione del ciclo cellulare o del processo di

apoptosi e quindi che si associno alla presenza di instabilità genomica. Come già accennato nel paragrafo precedente, diverse evidenze si stanno accumulando a favore di questa ipotesi, poiché negli ultimi anni lo studio di diversi di questi geni coinvolti nel mantenimento dell'integrità genomica e delle relative mutazioni ha reso possibile l'associazione con l'insorgenza di sindromi caratterizzate da instabilità genomica fino ad ora abbastanza ignote. L'utilizzo di modelli animali per approfondire gli effetti della mutagenesi di questi geni ha inoltre contribuito a rafforzare l'associazione con lo sviluppo di linfomi, la cui patogenesi sembra quindi derivare da una "disregolazione" nell'instabilità genomica "regolata" che contraddistingue il tessuto linfoide (fig. 9) (15).

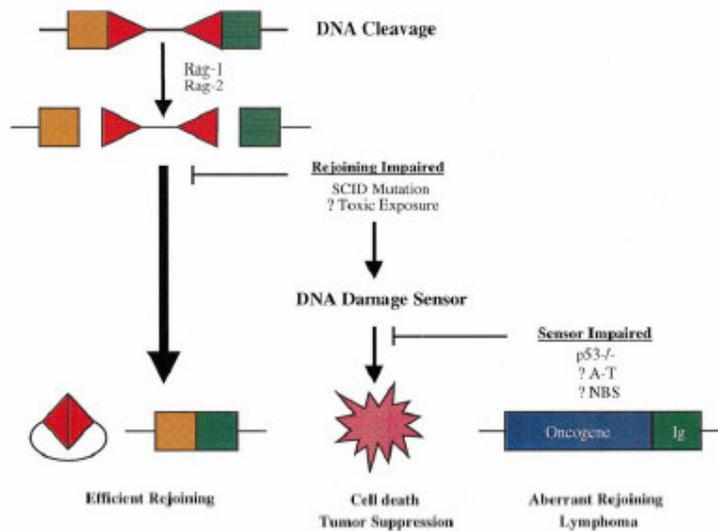


Fig.9 Modello di suscettibilità genetica all'insorgenza di traslocazioni durante il meccanismo di riarrangiamento V(D)J.

### 3. IL LINFOMA DI HODGKIN (LH)

### **3.1 Clinica e terapia del LH**

Con il termine linfoma si intende una patologia neoplastica sistemica clinicamente caratterizzata da un aumento di volume degli organi linfoidei primari e secondari, principalmente dei linfonodi. Dal punto di vista istopatologico i linfonodi neoplastici presentano disorganizzazione strutturale.

I linfomi vengono distinti in linfomi di Hodgkin e non Hodgkin. Il Linfoma di Hodgkin è una patologia nota già da oltre 150 anni, da quando sir Thomas Hodgkin lo descrisse per la prima volta e quando ancora era una malattia dall'esito rapidamente infausto. Attualmente rappresenta circa l'1% dei tumori che annualmente insorgono de novo nel mondo.

Non è stato individuato alcun gene malattia o alterazione genetica costante responsabile dell'insorgenza del Linfoma di Hodgkin, ma è stato osservato che questo tumore ha delle caratteristiche tipiche di un evento non casuale, che verranno più approfonditamente esaminate in seguito (16).

Nel 50% dei casi il paziente si presenta con pochi sintomi clinici; oltre alla tumefazione linfonodale, questi possono essere febbre, sudorazioni, prevalentemente notturne, calo ponderale e prurito 'sine materia'. Nella restante percentuale dei casi i pazienti non hanno nessun sintomo evidente e la diagnosi è casuale. Quando il LH esordisce senza sintomi viene definito 'varietà A', mentre se sono presenti uno o più sintomi viene definito 'varietà B'.

Nelle fasi seguenti il tumore può diffondersi in tre modi:

- per continuità, quando il tumore coinvolge tessuti circostanti il linfonodo interessato (ad esempio può invadere il parenchima polmonare per superamento della capsula dei linfonodi mediastinici);

- per via linfatica, quando il tumore si estende alle stazioni linfatiche successive al linfonodo colpito, seguendo i vasi linfatici;
- per via ematica, il tumore diffonde così in modo sistemico attraverso il sistema circolatorio; la diffusione per via ematica è generalmente la più tardiva.

Nel 1971 ad Ann Arbor è stata proposta una classificazione per i LH tuttora valida, anche se negli ultimi anni sono stati puntualizzati alcuni importanti aspetti per meglio determinare la prognosi di un Linfoma di Hodgkin. Nel 1989 si sono aggiunti nell'ambito di ciascuno stadio alcuni fattori prognostici rilevanti, quali l'entità dell'impegno mediastinico, il tipo di interessamento splenico, il numero di sedi interessate dalla malattia; questo perché è stato osservato che il decorso della malattia non dipende soltanto dallo stadio di presentazione, ma dalla 'quantità' globale di linfoma.

Per questo oggi, pur rimanendo valida la classificazione Ann Arbor, all'interno di ogni stadio si cerca di valutare correttamente i vari aspetti prognostici, di quantificare correttamente la malattia, in modo da poter assumere il miglior atteggiamento terapeutico.

### **Classificazione in stadi di Ann Arbor.**

Stadio I	Interessamento di una singola regione linfonodale (I) o di un singolo organo extralinfatico (Iε).
Stadio II	Interessamento di due o più regioni linfonodali poste tutte sopra o sotto il diaframma (II), con eventuale estensione ad un organo extralinfatico contiguo (IIε).
Stadio III	Interessamento di regioni linfonodali poste ad ambo i lati del diaframma (sopra e sotto). Lo stadio si definisce III <sub>s</sub> se è interessata la milza e III <sub>ε</sub> se il linfoma è esteso ad un organo extralinfatico contiguo.

Stadio IV	Interessamento diffuso di uno o più organi extralinfatici, con o senza interessamento linfonodale.
-----------	--

Per determinare lo stadio, oltre all'esame obiettivo, ci si avvale di altre indagini di tipo radiologico, radioisotopico ecc., ma l'indagine biptica è fondamentale: la diagnosi di Linfoma di Hodgkin non può prescindere dall'esame istologico.

Il prelievo biptico deve essere quanto più possibile ampio, la semplice esecuzione dell'ago aspirato non dà garanzie diagnostiche vista la scarsità delle cellule di Reed-Sternberg, considerate diagnostiche per il Linfoma di Hodgkin.

La diagnosi istologica è l'unica che permette di identificare un Linfoma di Hodgkin con certezza: viene eseguita su biopsia linfonodale e caratteristico del LH, oltre alla disorganizzazione strutturale del linfonodo stesso, è il reperimento delle cellule cosiddette di Reed-Sternberg (RS) e di altre cellule anomale, chiamate cellule di Hodgkin.

Le cellule di Reed-Sternberg sono di grandi dimensioni (20-60  $\mu\text{m}$ ), hanno citoplasma ampio e due, o anche più nuclei caratterizzati da membrana nucleare molto evidente, cromatina finemente dispersa e nucleoli voluminosi, che possono arrivare a coprire il 50% del volume nucleare. Le cellule di Hodgkin invece sono mononucleate, ma per il resto hanno caratteristiche simili alle RS.

Le cellule RS sono comunemente indicate come diagnostiche, ma è importante ricordare che non sono esclusive del LH, ma si possono ritrovare anche in corso di abnorme attivazione linfoide non neoplastica, come accade per esempio nella mononucleosi infettiva o in altri linfomi; da ciò discende che una corretta diagnosi di LH deve tenere conto del contesto istologico nel quale le RS (e/o le cellule di Hodgkin e varianti si trovano); per questo esiste anche una classificazione istopatologica dei LH, detta Classificazione di Rye, che si basa sul quadro citologico generale del linfonodo, quindi sul tipo di cellule ritrovate oltre alle HRS. Dal 1994 la Classificazione di Rye viene meno usata, visto che anche i LH sono stati inclusi nella

classificazione REAL (Revised European-American Lymphoma Classification) e sono stati suddivisi in due grandi gruppi: il LH a predominanza linfocitaria ed il LH classico; in quest'ultimo gruppo sono stati elencati i seguenti sottotipi:

- LH a sclerosi nodulare: è la variante più diffusa in Italia. Si distinguono due forme a seconda che la percentuale di cellule neoplastiche sia maggiore (tipo I) o minore (tipo II) del 25%. L'importanza della distinzione risiede nella risposta alla terapia, buona per il tipo I e peggiore per il tipo II.
- LH a cellularità mista: è caratterizzata da una grande quantità di cellule reattive, per lo più da granulociti.
- LH a deplezione linfocitaria: è la meno diffusa tra le varianti; si distingue una forma fibrosa e in una sarcomatosa; la seconda forma è quella più aggressiva.
- LH classico ricco in linfociti.

Il LH a predominanza linfocitaria è caratterizzato dal reperto di molte cellule di Reed-Sternberg, rare cellule di Hodgkin e di elementi varianti specifici, indicati come cellule linfo-istiocitiche o 'pop-corn'. Diversamente dalla variante classica mostra un picco di incidenza unimodale, corrispondente alla quarta decade di vita. Il LH a predominanza linfocitaria può essere ulteriormente suddiviso, in termini architetturali, in nodulare (80% dei casi) e diffuso (17).

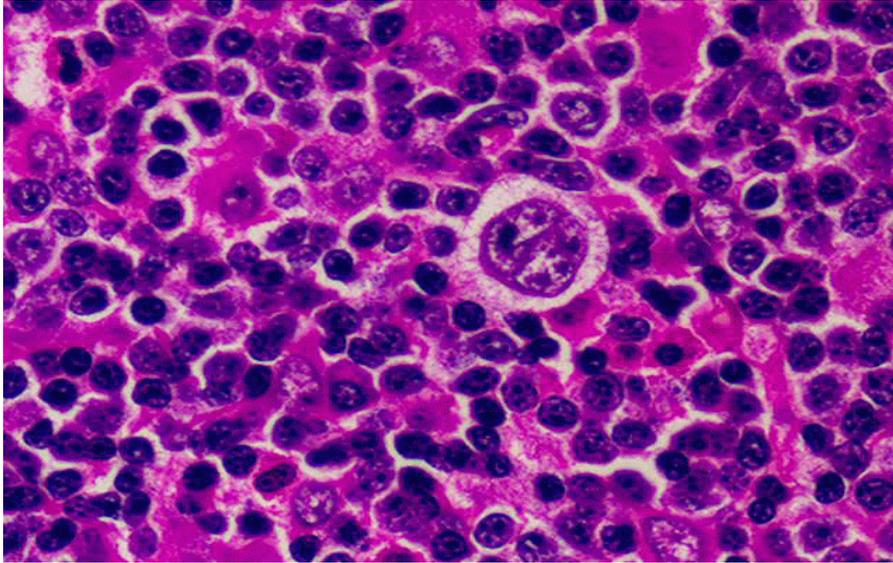


Fig. 9 Cellula di Reed-Sternberg.

Il LH rappresenta il più grande successo terapeutico della chemioterapia e della radioterapia dell'ultimo trentennio; ad oggi il 70-80% circa di tutti i pazienti trattati per questa patologia possono essere considerati guariti.

Negli anni '60, fino agli anni '80, l'approccio standard era la radioterapia a campi estesi. La dose variava dai 30 ai 44 Gy a seconda che la malattia fosse sopra o sottodiaframmatica. Con tale approccio terapeutico la sopravvivenza generale a 10 anni era del 90% e la sopravvivenza libera da malattia del 75-80%. Circa il 20% dei pazienti trattati con la sola radioterapia evidenziava però recidive e si è tentato di individuare quei fattori prognostici predittivi per la recidiva allo scopo di limitare la radioterapia ai soli pazienti con buona prognosi; oggi il trattamento radioterapico è d'elezione per i pazienti con malattia in stadio clinico I e II A sopradiaframmatico.

Dalla fine degli anni '70 è stata introdotta anche la chemioterapia nei pazienti con malattia localizzata. Alcuni gruppi hanno testato l'efficacia del solo trattamento chemioterapico al fine di evitare gli effetti collaterali a lungo termine della radioterapia. Il primo schema utilizzato fu la MOPP (Mecloretamina, Vincristina, Procarbazine, Prednisone) che non è più particolarmente diffuso in quanto è stato osservato un aumentato rischio di sviluppare una leucemia acuta secondaria (LAM)

tra i pazienti trattati con questo protocollo; attualmente i protocolli più usati sono ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina) e VBM (Vinblastina, Bleomicina, Methotrexate) che non comprendono agenti alchilanti e quindi recano un danno genotossico più limitato (18). Secondo una revisione sistematica del 1998, riguardante i risultati di 8 studi randomizzati su 1974 pazienti con malattia in stadio iniziale, ci sarebbe un vantaggio significativo nell'utilizzo della terapia combinata, radioterapia + chemioterapia; altri gruppi hanno ottenuto risultati addirittura discordanti rispetto a questa metanalisi. Probabilmente per quello che riguarda gli stadi iniziali esistono ancora alcuni punti controversi, per esempio quale schema di chemioterapia usare, che non permettono di dare un'indicazione certa. Per quel che riguarda invece gli stadi avanzati la terapia combinata dà migliori risultati (19, 20).

Per malattie più avanzate è stata proposta una terapia sopramassimale, seguita da trapianto di midollo osseo autologo o allogenico. Fino a pochi anni fa il trapianto di midollo allogenico era poco conosciuto e praticato, soprattutto a causa dell'alta mortalità correlata alla metodica (circa il 40%). Con l'aumentare delle conoscenze, il miglior controllo delle complicanze infettive e l'uso delle terapie immunosoppressive, si è riaperto l'interesse verso questa metodica; inoltre alcune osservazioni depongono a favore del suo utilizzo:

- minor incidenza di recidive della malattia dopo trapianto allogenico rispetto all'autologo
- correlazione diretta tra GVHD e probabilità di guarigione.

Sono stati studiati anche una serie di nuovi approcci, che coinvolgono per lo più l'immunoterapia, alcuni dei quali sono già in fase di sperimentazione clinica e vengono generalmente combinati ai protocolli classici di chemioterapia al fine di prevaricare l'insorgenza della resistenza alla chemioterapia convenzionale da parte delle cellule H-RS. Fra questi occorre menzionare:

- immunotossine, derivanti dalla fusione di un MoAb diretto verso un antigene specifico (es. CD30) con una tossina vegetale o batterica (ricina, tossina

difterica ecc.); il problema di questa metodica è l'aspecificità dei diversi CD, che sono spesso presenti anche su tessuti sani. Una di queste immunotossine, la VCD25-ricina è stata somministrata a 17 pazienti ottenendo però solo risposte parziali. Questo è probabilmente dovuto al fatto che solo il 30% delle cellule HRS esprime il CD25 (21);

- anticorpi bispecifici, contengono due diversi siti di riconoscimento dell'antigene, sulla cellula neoplastica e sulle cellule effettrici dell'immunità come macrofagi, cellule T o natural killer. Si possono ottenere tramite la fusione somatica di due linee cellulari di ibridoma o con tecniche ricombinanti; 15 pazienti sono stati trattati con anticorpi indirizzati anti-CD16-CD30: tale molecola lega con un braccio le HRS e con l'altro le cellule NK. Anche in questo caso la difficoltà maggiore è l'eterogeneità fenotipica e i risultati non sono ottimi, ma si è ottenuta una remissione completa (22).

L'alta percentuale di guarigioni da LH è controbilanciata però da una morbilità e mortalità correlate ai trattamenti piuttosto elevate. A 15 anni dalla diagnosi, la mortalità per cause diverse dal LH supera quella di una popolazione di controllo (23).

Le **complicanze** più frequenti sono

- complicanze cardiache
- complicanze polmonari
- sterilità
- tossicità tiroidea
- seconde neoplasie.

Secondo uno studio epidemiologico italiano la probabilità di avere un secondo tumore dopo essere stati curati per il Linfoma di Hodgkin è del 10.1% a 15 anni e del 14.9% a 20 anni dal trattamento (24). Nello studio italiano i tumori più frequentemente rilevati sono quelli del polmone (23%), leucemie acute (15%) e della mammella (12%). A questi vanno aggiunti Linfomi non-Hodgkin (8%), tumori del distretto testa-collo (8%) e tumori gastrointestinali (12%). Per quanto riguarda

l'insorgenza di leucemie e sindromi mielodisplastiche, si è visto che la chemioterapia, in particolare le dosi di agenti alchilanti, nitrosuree e epidofillotossine del protocollo MOPP e il numero di cicli, ma probabilmente non la terapia radiante, correlano con il rischio di insorgenza: infatti l'incidenza di leucemia è stata ridotta dall'introduzione del protocollo ABVD e dalla riduzione del numero di cicli. La radioterapia sembra essere invece correlata all'insorgenza dei secondi tumori solidi, anche se sia la relazione dose-effetto che l'impatto della dimensione dei campi di irradiazione sono meno chiari. L'esperienza pediatrica suggerisce che l'incidenza di seconde neoplasie sia maggiore per dosi più elevate di radiazioni (25). I modelli animali hanno dimostrato inoltre che la dimensione dei volumi irradiati ha un impatto sulla carcinogenesi. E' importante notare che nella maggioranza dei casi i tumori secondari si localizzano ai margini delle sedi irradiate, a livelli di tessuti che hanno ricevuto dosi di radiazioni relativamente basse (comprese tra 5 e 8 Gy) (26). Esiste anche una distribuzione ben definita dei tempi di comparsa delle seconde neoplasie: per le leucemie la media è di 6.6 anni, mentre per le neoplasie solide è di 12 anni (15 per il cancro della mammella).

Da uno studio fatto su 1080 pazienti, tutti in stadio precoce e tutti trattati ad un età di 50 anni o inferiore, si sono ottenuti i dati a proposito della sopravvivenza dei pazienti alla malattia e alle conseguenze del trattamento.

La morte dovuta a LH ha il massimo impatto sulla sopravvivenza nei primi 15 anni dopo il trattamento, ma non si registrano morti dopo questo periodo. Circa 14 anni dopo il trattamento l'incidenza cumulativa delle morti per altre cause supera quella delle morti per LH. Dopo 18 anni l'incidenza cumulativa delle morti dovute a neoplasie secondarie, da sola, supera l'incidenza delle morti da LH. I dati a proposito di follow-up più lunghi di 20 anni sono ancora scarsi e insufficienti per poter trarre conclusioni attendibili (27).

L'alta incidenza di seconde neoplasie dopo la guarigione dal LH ha indotto ad ipotizzare la presenza di mutazioni germ-line in questi pazienti che, manifestandosi con instabilità genomica, potessero predisporre in generale allo sviluppo di tumori. A

questo riguardo, sono stati effettuati alcuni studi volti a verificare la presenza di instabilità microsatellitare o di mutazioni in geni oncosoppressori come p53, che non hanno però portato a risultati univoci, per cui ad oggi non sono stato ancora identificati i fattori genetici intrinseci che predispongono allo sviluppo di questi secondi tumori (28).

### **3.2 Origine delle cellule di Reed-Sternberg.**

La natura clonale delle cellule HRS è rimasta oscura per molto tempo soprattutto a causa della loro scarsità; la caratterizzazione immunofenotipica non permette di indicare in modo univoco una cellula emopoietica normale come progenitrice delle cellule neoplastiche e solo nel sottotipo a prevalenza linfocitaria le HRS esibiscono un fenotipo consistente con origine da cellule B mature.

I geni delle Immunoglobuline sono riarrangiati solo nelle cellule di origine B, ragion per cui questi geni rappresentano i marker ideali per determinare l'origine e l'eventuale relazione clonale delle HRS con il lineage B. Se le cellule HRS avessero origine T ci si aspetterebbe invece di trovare riarrangiati i geni del complesso del T cell receptor (TCR). Con il miglioramento delle tecniche di biologia molecolare e l'avvento della "single-cell PCR" è stato possibile analizzare i geni nelle cellule HRS e si è dimostrato che nella quasi totalità dei casi sono i geni Ig ad essere riarrangiati, per cui è ormai assodato che le cellule HRS derivino da un precursore B nel 98-99% dei casi e da un precursore T nel residuo 1-2%.

Le HRS sono caratterizzate dalla presenza di mutazioni somatiche nelle regioni V dei geni delle Ig, che insorgono normalmente nel corso delle risposte immunitarie nei centri germinativi (GC) degli organi linfoidi tramite un processo denominato ipermutazione somatica.

Ulteriori osservazioni hanno dimostrato la presenza di mutazioni inefficaci (in particolare mutazioni non-sense che generano stop-codon precoci e delezioni che generano frame-shift) a carico della regione V dei geni che codificano per le Ig. Questo genere di mutazioni occorre spesso nei linfociti B del centro germinativo: in

condizioni fisiologiche, tuttavia, le cellule che le portano (“crippled”) vanno rapidamente incontro ad apoptosi; le HRS invece resistono all’apoptosi utilizzando il meccanismo di signaling del CD40 e dell’attivazione del fattore nucleare NFkappaB. Questo fa pensare quindi ad una origine clonale per le cellule HRS da cellule B pre-apoptotiche del centro germinativo.

A differenza quindi dei centroblasti le cellule HRS non sono in grado di secernere anticorpi, perché non ne avviene la produzione: oltre a circa un 25% di HRS che portano mutazioni con la conseguente formazione di stop codon all’interno delle ORF dei geni delle Ig sono stati identificati alcuni fattori di trascrizione importanti per l’espressione di Ig, quali Oct2 (Octamer binding factor 2), BOB.1 (B cell Oct binding protein , chiamato anche OBF.1) e PU.1 (membro della famiglia ETS) come down-regolati e quindi inefficaci nel favorire la trascrizione dei geni delle Ig (29-31).

#### **4. INSTABILITA’ GENOMICA NEL LINFOMA DI HODGKIN**

Per il morbo di Hodgkin non è stato individuato un gene malattia o un’alterazione genetica costante, che sia in grado di spiegarne l’insorgenza. D’altra però in questo tumore troviamo delle caratteristiche che fanno fortemente sospettare un evento non stocastico. C’è l’ipotesi che dietro la comparsa di questa neoplasia ci sia un qualche meccanismo genetico costante che possa essere considerato come il ‘primum momens’ dell’insorgenza del tumore. Sono in particolare tre le caratteristiche a favore di questa ipotesi:

- 1.Familiarità e Anticipazione;
- 2.Eventuale aplotipo HLA che spieghi l’implicazione del virus dell’Epstein-Barr nell’insorgenza ma soprattutto nella progressione e nell’evoluzione della prima cellula tumorale;
- 3.Alta percentuale di Seconde Neoplasie Maligne in seguito ai trattamenti terapeutici.

#### **4.1 Linfomi di Hodgkin familiari e il fenomeno dell'anticipazione**

E' noto da molti anni che questo tumore tende ad insorgere in diversi membri di una stessa famiglia anche lungo diverse generazioni. Tra fratelli, fino all'età di 45 anni, aumenta di sette volte il rischio di sviluppare un LH, probabilità che è ulteriormente maggiore tra i gemelli (32). Analizzando invece i casi in cui il tumore è comparso sia nei genitori che nei figli si assiste ad un altro fenomeno, quello dell'anticipazione, messo in evidenza da uno studio scandinavo in cui sono stati presi in considerazione diversi casi familiari. Oltre ad aver constatato un'ereditabilità verticale di circa il 28%, si è analizzata l'età media di insorgenza del tumore tra genitori e figli, con i seguenti risultati che evidenziano la presenza dell'anticipazione della malattia:

	ETÀ D'INSORGENZA NEI GENITORI	ETÀ D'INSORGENZA NEI FIGLI
Genitori nati prima del 1930	27,2 anni	19 anni
Genitori nati dopo il 1930	38,41 anni	25,58 anni

Il motivo preciso di questo fenomeno non è ancora noto, ma questo dato va associato con la constatazione di una certa instabilità genetica nei linfociti circolanti in malati di Hodgkin, prima di qualsiasi trattamento terapeutico (33).

#### **4.2 Correlazione con un aplotipo HLA sfavorevole**

Studi epidemiologici hanno dimostrato che il virus di Epstein-Barr si può ritrovare in circa il 50% dei pazienti con HL (33). I meccanismi mediante cui EBV sarebbe in grado di far progredire il Linfoma di Hodgkin vedono coinvolte principalmente due proteine di membrana virali: LMP1 e LMP2a.

LMP1 (Latent Membrane Protein 1) è in grado di mimare una proteina di membrana cellulare allo stato attivato, la CD40. Essa si trova nel caso dell'attivazione di un linfocita B da parte di un linfocita Th2 antigene specifico, richiamando molte molecole di trasduzione del segnale. Tra queste le più importanti sono sicuramente le TRAFs. Queste iniziano una cascata che porta all'attivazione di NF-κB con conseguente proliferazione cellulare.

LMP2a (Latent Membrane Protein 2a) ha un motivo citoplasmatico detto ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). Si tratta di un motivo peculiare del BCR attivato, in grado di far partire una cascata anti-apoptotica. In questo modo le cellule sarebbero in grado di sopravvivere nonostante non siano dotate di un proprio BCR funzionale (30).

Si è cercato di individuare un eventuale caratteristica sfavorevole, che spieghi come mai il virus scateni il tumore solo in una cellula, in una piccola percentuale di coloro che subiscono un'infezione da EBV, ma finora i diversi studi effettuati in questo ambito non hanno avuto esito conclusivo (34). A tutt'oggi l'allele DPB1\*0301 sembra essere associato con il Linfoma di Hodgkin, mentre l'allele DPB1\*0201 sembra conferire una certa resistenza alla malattia. Facendo studi su casi familiari di Hodgkin con sclerosi nodulare, è risultato con una frequenza molto alta, ben il 72,7%, un particolare aplotipo: DRB1\*1501, DQB1\*0602 e DRB1\*1104. Inoltre si è riscontrato che un altro allele segrega con questi, DRB5\*0101. Infine la variante all'elica della TAP1, con Ile al residuo 333 al posto della Val mostra un certo linkage disequilibrium (34).

### **4.3 Evidenze a favore dell'instabilità genomica nel Linfoma di Hodgkin**

Il primo dato a favore di queste evidenze riguarda una caratteristica già menzionata, e che cioè nel 25% dei geni delle Ig troviamo, a causa di errori nel riarrangiamento genico, degli stop codon precoci. Valore altissimo se confrontato con il 4% in una popolazione sana di controllo. Inoltre il fatto stesso che le cellule di Reed-Sternberg siano grosse cellule plurinucleate, fa presupporre che ci possa essere stato qualche

errore a livello della segregazione dei cromosomi durante la replicazione cellulare (17). Assieme a queste evidenze ce ne sono anche altre che mostrano un certo grado di instabilità genetica nelle cellule tumorali: le cellule HRS mostrano cariotipi anormali, con perdite e acquisizioni di interi cromosomi; mediante analisi di citogenetica classica si è trovato un range di metafasi anormali che va dal 13 al 92%. A ciò si somma il fatto che esistono aberrazioni cromosomiche con una frequenza statistica particolarmente elevata. In particolare, con l'uso della tecnica dei CGH, si è potuto constatare che le alterazioni maggiori riguardano le regioni 2p, 4q, 5q, 6, 9p, 11q e 12q. Andando poi a verificare mediante FISH quali fossero i siti più amplificati si è scoperto che si trattava dei geni Jak2 (9p23-24), MDM2 (12q14), c-Rel (2p) e ATM (11q22-23) (38,39). Tra questi, ATM è un gene che mutato porta ad una patologia autosomica recessiva, caratterizzata tra l'altro da forte instabilità genetica. Questa instabilità porta i malati di Atassia-Telangectasia a tutta una serie di tumori tra cui anche il Linfoma di Hodgkin (40). Finora era stata esclusa una correlazione tra questo gene e la malattia. Questo perché non era stata finora riscontrata nei pazienti la delezione del gene o l'espressione di una qualche variante tronca della proteina. Recentemente alcuni studi hanno associato l'insorgenza di un LH nei bambini con la presenza di particolari SNPs (Single Nucleotide Polimorphisms) nel gene ATM. Si tratta della sostituzione di una singola base azotata nella parte codificante del gene, che comporta una sostituzione amminoacidica nella proteina. Queste proteine varianti generalmente sono meno efficaci nella loro risposta agli stress genotossici. La perdita di attività può raggiungere addirittura il 30% per alcuni SNPs, per cui rende atto di una maggiore suscettibilità ai tumori (41,42).

Le cellule HRS sono state analizzate anche per la presenza di mutazioni in oncogeni e oncosoppressori: l'analisi degli oncogeni bcl-2 e n-ras mostra assenza di mutazioni nella maggior parte dei casi, come anche nei geni di controllo dell'apoptosi p53 e Fas/CD95, mentre sono state rilevate frequenti mutazioni nei geni che codificano per IκB e nel gene bcl-6 (43).

#### **4.4 Alta percentuale di Seconde Neoplasie Maligne in seguito ai trattamenti terapeutici**

Nonostante la strategia terapeutica dell'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) già a partire dal 1969 sia stata quella di proporzionare l'aggressività del trattamento a quella della malattia, questo atteggiamento di "prudenza terapeutica" non ha tuttavia significativamente migliorato la prognosi della malattia, per cui a tutt'oggi la mortalità dei pazienti con LH a più di 20 anni di trattamento è di 3-4 volte superiore a quella di una popolazione di controllo (44). In termini generali l'ipotesi più plausibile è che il rischio di neoplasie secondarie sia tanto più elevato quanto più alto è l'accumulo di lesioni al DNA indotto da ogni ciclo di chemioterapia sommato a quello indotto dalle radiazioni ionizzanti, ipotesi che colloca il problema delle neoplasie secondarie nei pazienti con LH nel più ampio scenario del ruolo dell'instabilità genetica nella patogenesi dei tumori (26).

Sono ormai molti gli studi che mostrano chiaramente una correlazione tra terapia e la comparsa di seconde neoplasie (23, 25). In particolare secondo un grosso studio epidemiologico condotto in Italia, risulta che la probabilità di avere un secondo tumore dopo essere stati curati per il Linfoma di Hodgkin è del 10,1% a 15 anni e del 14,9% a 20 anni dal trattamento. Questi dati concordano con quelli di altri gruppi secondo cui dopo 15 anni circa l'85% della popolazione colpita è libero da tumori. La radioterapia sembra essere la maggiore indiziata per quanto riguarda la comparsa di secondi tumori solidi, mentre la chemioterapia è più correlata alla comparsa di leucemie secondarie. Gli studi hanno molto bene messo in evidenza la correlazione tra tipo, intensità, durata ed estensione della cura e le ripercussioni sul paziente. Nel caso italiano su una popolazione di 1524 casi trattati per LH dal 1960 al 1991, ben 141 secondi tumori sono stati riscontrati in 138 soggetti. I secondi tumori più frequenti sono stati il cancro del polmone (23%), leucemie (15%) e il cancro della mammella (12%), a cui vanno aggiunti altri linfomi non-Hodgkin per l'8%, tumori di

testa e collo per l'8% e tumori gastrointestinali per il 12%. Diversi sono anche i tempi di comparsa delle seconde neoplasie: si va da una media di 6,6 anni per le leucemie ai 12 anni dei secondi tumori solidi, fino ai 15 anni per il cancro alla mammella. Sono risultati più soggetti i maschi delle femmine (18% vs. 8,9%), e la probabilità aumenta con l'età in cui si è stati curati per LH, dal 5,7% dei <28 anni al 25,6% dei >44 anni (24). La probabilità di secondi tumori solidi aumenta nettamente con l'aumentare del numero dei cicli di radioterapia. Nel caso della leucemia invece sono più soggetti coloro che hanno avuto un trattamento chemioterapico, in particolare chi è stato trattato con il vecchio protocollo MOPP, che include un agente alchilante, la mostarda azotata. L'associazione della radioterapia a protocolli di chemioterapia incrementa ulteriormente il rischio di sviluppo di seconde neoplasie (35, 45).

Questi dati mostrano indubbiamente come la terapia utilizzata negli scorsi decenni per il Linfoma di Hodgkin andasse calibrata e avvalorano la sostituzione del protocollo ABVD nei confronti del MOPP, le cui ripercussioni a lungo termine sono sicuramente maggiori, e l'uso di attenzioni particolari per rendere la radioterapia più mirata sul target. Dal '95 in poi nella terapia del LH è stato quindi perseguito un duplice obiettivo: da una parte l'individuazione della minima terapia curativa per ogni singolo paziente e dall'altro il minor pedaggio in termini di qualità di vita ed effetti collaterali avversi.

## **SCOPO DELLA TESI**

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di chiarire se vi sia una suscettibilità genetica alla manifestazione dell' instabilità genomica che, oltre a caratterizzare il LH, favorisca anche lo sviluppo anche dei tumori secondari al LH e quindi se si possa determinare la presenza di un background genetico comune negli individui che si ammalano di LH e, di seguito alla guarigione, sviluppano tumori secondari al LH.

Si è quindi cercato di individuare una identità nel profilo genico dei pazienti che sviluppano LH e di seguito tumori secondari che supporti l'instabilità genomica come fattore patogenetico rilevante in entrambe le neoplasie e che serva ad identificare all'esordio clinico i pazienti affetti da LH che hanno un rischio più elevato di insorgenza di un secondo tumore. Oltre a gettare luce sui meccanismi di patogenesi e progressione del LH, questo progetto ha un potenziale impatto sulla prognosi di malattia di pazienti la cui aspettativa di vita potrebbe essere aumentata dalla riduzione o dalla redistribuzione del carico terapeutico utilizzato per il LH oppure dall'introduzione nella pratica clinica di nuovi protocolli terapeutici basati su terapie mirate che, a parità di efficacia clinica, infliggano un danno genotossico minore sui genomi dei pazienti da curare.

# MATERIALI E METODI

## 1. Materiali

Il numero relativamente esiguo di pazienti con LH che sviluppano un secondo tumore e il lungo tempo di latenza tra l'insorgenza del LH e delle neoplasie e leucemie secondarie (fino ad oltre 15 anni) ci hanno indotto ad optare per uno studio retrospettivo che è stato effettuato sulle biopsie di tessuto linfomatoso e tumore o leucemia secondari (disponibili presso la Sezione di Emolinfopatologia dell'Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L. e A. Seràgnoli dell'Università di Bologna) da pazienti caratterizzati per il quadro clinico all'esordio, per i tipi di trattamento eseguiti e per il follow-up a lungo termine presso l'Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L.e A. Seràgnoli" e per le modalità di trattamento radioterapico (qualora questo sia stato effettuato) presso l'Istituto di Radioterapia "L. Galvani" dell'Università di Bologna.

La casistica degli Istituti di Ematologia e Oncologia Medica "L. e A. Seragnoli" e di Radioterapia "L. Galvani" conta 1256 pazienti giunti alla diagnosi di LH dal 1972 ad oggi. Di questi, 121 pazienti hanno sviluppato una neoplasia secondaria in seguito alla guarigione dal primo tumore: 6 pazienti hanno sviluppato una LAM, 21 pazienti hanno sviluppato un LNH, 17 pazienti hanno sviluppato un carcinoma polmonare, 9 pazienti un carcinoma della mammella e i restanti pazienti hanno sviluppato altri tipi di tumore secondario.

I materiali su cui è stato condotto lo studio sono le biopsie linfonodali dei tumori primari (LH) e secondari (LAM e LNH) di 13 pazienti, dei quali abbiamo potuto recuperare i blocchetti inclusi in paraffina effettuati alla diagnosi del primo e del secondo tumore, e di un numero congruo di controlli normali.

Le caratteristiche cliniche quali diagnosi e terapie utilizzate sia dei campioni che dei controlli sono state raccolte in tabelle riportate nelle sezioni a seguire, divise in base al tipo di neoplasia secondaria sviluppata.

## **2. Metodi**

### **2.1 Estrazione del DNA.**

L'estrazione del DNA dai campioni viene fatta a partire da fettine sottili ricavate dalla biopsia inclusa in un blocchetto di paraffina (5-7 fettine). E' importante premettere che estrarre DNA di ottima qualità partendo da campioni conservati in paraffina è estremamente difficile in quanto il trattamento per eliminare i residui di paraffina è alquanto aggressivo. Quindi in questo caso si è cercato di ottimizzare il protocollo (tempi di incubazione e volumi in cui risospendere il DNA finale) per ottenere il giusto compromesso tra quantità e qualità di materiale su cui lavorare. Per estrarre il DNA è stato utilizzato il kit commercializzato dalla Qiagen (QIAamp DNA Blood Mini Kit) basato sul sistema delle colonnine d'eluizione in silicio. L'estrazione richiede due giorni: durante la prima giornata viene eliminata la paraffina e viene lisato il tessuto, mentre durante la seconda avviene l'estrazione vera e propria.

Dopo questo primo step è necessario quantificare il DNA estratto, dal momento che per i CGH Microarray è necessario partire da una quantità di acido nucleico di 100 ng risospesi in un massimo di 4µl. Per dosare il materiale genomico in questione è stato utilizzato il NanoDrop ND-1000, che permette di ottenere dosaggi estremamente affidabili e ripetibili.

### **2.2 DOP-PCR.**

La DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide Primed - Polymerase Chain Reaction) è una variante della classica PCR messa a punto con l'intento di amplificare in maniera aspecifica il DNA genomico. La DOP-PCR non è un passaggio obbligatorio, la si fa in quei casi in cui la quantità di DNA è troppo esigua per poter essere utilizzata per i CGH-microarray. Per questa reazione si usano dei primers con una regione centrale di 6 bp degenerati, che statisticamente rappresentano tutte le possibili sequenze del genoma. Questa regione si trova vicino alla estremità 3' del primer ed è seguita da un



### **2.3 CGH (Comparative Genomic Hybridization) Microarray.**

La tecnica CGH viene usata in citogenetica per comparare cromosomi in metafase e valutare l'esistenza di delezioni o amplificazioni; la CGH tradizionale tuttavia ha una scarsa sensibilità, in quanto permette la rilevazione solo di alterazioni grossolane, nell'ordine delle 20Mb. I CGH Microarray si basano sugli stessi principi della CGH tradizionale, con il vantaggio che gli array permettono l'analisi contemporanea di molti segnali con risultati altamente sensibili, al punto tale da poter fare valutazioni a proposito di singoli geni. Per questo progetto è stato utilizzato un chip messo a punto dalla Abbot (GenoSensor Array300, Abbot-Vysis) che analizza contemporaneamente 287 loci genici. I geni inseriti nel chip sono quelli più frequentemente alterati nei tumori umani. Si è cercato quindi di vedere se questi loci sono alterati nei LH rispetto ai controlli o se sono alterati nei tumori secondari rispetto al tumore primario e ai controlli e se si riscontrano le stesse alterazioni tra LH e tumori secondari.

Per ogni array si parte da 100 ng di DNA sia del campione (che viene chiamato Test) sia del controllo (chiamato Reference). L'acido nucleico viene digerito con delle nucleasi e in seguito viene effettuata una reazione di polimerizzazione che permette di inserire i fluorocromi nella sequenza; è stato utilizzato il fluorocromo rosso (Cy5) per il Test e il verde (Cy3) per il Reference. Ai due campioni viene aggiunto Cot1, una miscela di DNA di sequenze ripetute e a questo punto si aggiunge la miscela di DNA sul vetrino con il DAPI, un reagente che colora di blu le regioni di eterocromatina costitutiva. Dopo tre giorni d'incubazione a 37 °C si analizza il vetrino ad un apposito scanner e si misura l'emissione dei fluorocromi nei vari spot. In particolare lo scanner effettua tre letture: una per il verde, una per il rosso e una per il blu, che rappresenta il rumore di fondo.

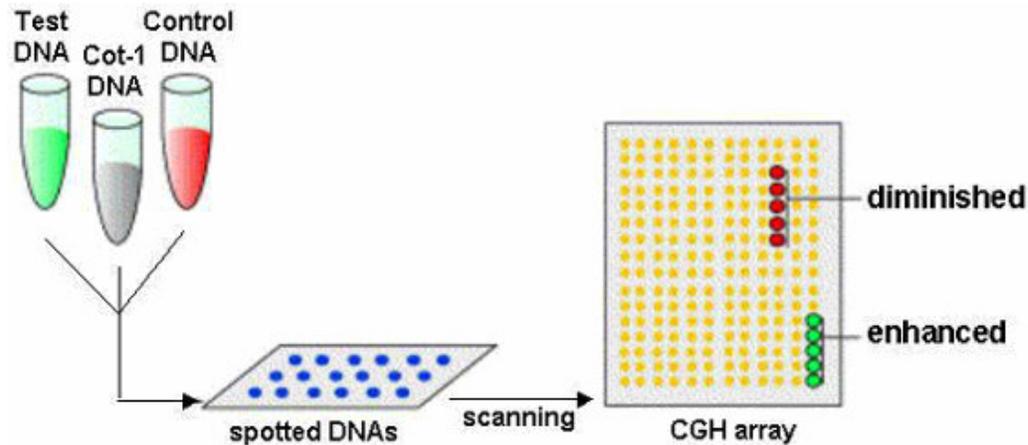


Fig.12 Schema dei CGH Microarray

Per ogni spot viene calcolato il rapporto tra l'intensità delle emissioni del verde rispetto al rosso, ottenendo un valore chiamato TRN (test to reference normalized). Nel caso in cui il gene/regione si trovi in esatto numero di copie tra test e reference questo valore è pari a 1. Se il TRN risulta maggiore di 1.20 si può affermare che il gene/regione è amplificato nel test, mentre un TRN inferiore a 0.82 ci indica perdita di copie o regioni geniche. Questi valori soglia sono stati confermati con esperimenti preliminari in cui sono stati ibridizzati DNA estratti da individui sani differenzialmente marcati (maschio vs femmina e femmina vs maschio). I risultati degli esperimenti di microarray sono stati inizialmente esaminati con un software dedicato fornito dal Genosensor (che permette di eliminare geni che mostrano un p-value superiore a quello prestabilito) e di seguito sono stati ulteriormente sottoposti ad accurata analisi statistica per mantenere solamente quelli significativi (è stata utilizzata la statistica del t-test e per confronti multipli fra pazienti la correzione di Bonferroni o il metodo di Benjamini-Hochberg).

## 2.4 FISH

I risultati dei CGH microrrays sono stati validati mediante tecniche di ibridazione in situ (FISH) con sonde specifiche marcate direttamente per incorporazione di precursori nucleotidici fluorescinati per i geni che hanno mostrato alterazioni strutturali ( nel nostro caso, sulla base dei risultati dei CGH microarray, si è scelto di osservare con l'ibridazione in situ i geni p16 e N-myc).

Sezioni delle biopsie di 3  $\mu\text{m}$  di spessore sono state sottoposte a sparaffinamento mediante incubazione overnight in Histoclear a 37°C seguita da lavaggi in etanolo (assoluto, 96%, 90%, 80%, 70%) e acqua distillata. Dopo un ultimo lavaggio in 2X SSC a temperatura ambiente, i campioni sono immersi in una soluzione di digestione per 45 minuti a 45°C e nella soluzione di denaturazione a 72°C per 5 minuti. L'ibridazione con le sonde specifiche per i singoli geni è condotta a 37°C per 24 ore, seguita da una co-denaturazione di 1 minuto a 68°C, lavaggi e colorazione con DAPI. I segnali vengono riconosciuti attraverso l'osservazione dei vetrini al microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse 1000) equipaggiato con filtri adeguati per distinguere il numero di copie del gene di studio.

La sonda utilizzata per ibridare la regione contenente p16 è LSI 9p21/CEP-9 Dual Color Probe della Vysis. Essa ibrida a livello della banda 9p21 (Spectrum Orange, arancione) e a livello del centromero del cromosoma 9 (Spectrum Green, verde).

La sonda a livello della banda 9p21 si estende per circa 190kb e copre diversi loci: D9S1749, D9S1747, p16(INK4A), D9S1748, p15(INK4B) e D9S1752.

La sonda utilizzata per N-myc è LSI N-myc Spectrum Orange, sempre della Vysis, e ibridizza a livello della regione 2p23-24 del cromosoma 2. Come controllo per la sonda di N-Myc è stata utilizzata la sonda Cep2, che ibridizza a livello della regione cromosomica centromerica.

Su ogni vetrino sono stati analizzati 50 nuclei per ogni sonda; vengono rilevate amplificazioni se il rapporto fra il numero di spots del gene preso in considerazione e del gene di riferimento risulta superiore a 2N+1, mentre si considera che sia presente

una delezione se il rapporto risulta inferiore a 1 (con N corrispondente al numero di spots del gene di riferimento rielvati).

## **2.5 Immunoistochimica.**

L'immunoistochimica nasce dall'unione di tecniche immunologiche ed istochimiche e permette di rivelare ed interpretare la presenza di specifici antigeni all'interno di un contesto morfologico dato.

Nel nostro caso i campioni da analizzare sono tessuti inclusi in paraffina che devono essere tagliati in sezioni molto sottili mediante un microtomo e devono essere montati su vetrino. In seguito occorre un anticorpo specifico che si leghi alla proteina nella sezione di tessuto e possa così fornire dati sull'espressione della medesima.

La prima fase dell'indagine immunoistochimica consiste nella preparazione delle sezioni, che vengono raccolte su vetri portaoggetto a carica elettrica. Si esegue la sparaffinatura delle sezioni con una serie di passaggi in HistoClear e etanolo e le sezioni vengono poi reidratate in acqua distillata.

La fase successiva consiste nello smascheramento antigenico, che si rende necessario per la maggior parte degli anticorpi utilizzati e varia in base all'anticorpo primario utilizzato (nel caso dell'anticorpo anti-WT1 ad esempio richiede un trattamento proteolitico, mentre per l'anti-p21 si esegue un trattamento con calore con forno a micro-onde).

Si procede dunque con l'analisi immunoistochimica mediante la tecnica APAAP (Fosfatasi Alcalina Anti-Fosfatasi Alcalina) con procedura automatizzata. L'immunocoloratore automatico guida i vetrini nelle diverse soluzioni contenenti il siero intero, gli anticorpi primari, l'anticorpo secondario, i complessi APAAP e i tamponi per i lavaggi. Al termine le sezioni vengono lavate e contrastate con Ematossilina di Gill prima di essere sigillate con vetrino coprioggetto.

Per la validazione dei risultati di CGH microarray abbiamo scelto di andare a verificare l'espressione dei geni FES (Abgent), HRAS e WT1 (Dako), PPARBP e GATA3 (Santa Cruz Biotech.), Top1, FGFR1 e FGR(SRC2) (Abcam).

## **2.6 Cattura delle diverse componenti linfonodali mediante microdissezione laser**

La microdissezione laser è stata realizzata su sezioni (4-5 µm di spessore) provenienti da tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina sottoposte a deparaffinamento con Bio Clear, lavate in etanolo da 100% a 80% e infine colorate con ematossilina-eosina. Utilizzando un microdissettore laser (Nikon SL microcut) da ogni campione di LH sono state isolate 100 singole cellule di Reed Sternberg e da ogni campione di LNH sono stati isolati clusters di cellule tumorali costituiti da 500 a 1000 cellule. I controlli usati per la microdissezione e la PCR sono le componenti linfonodali non tumorali dello stesso paziente microdisseccate da sezioni adiacenti a quelle tumorali.

Le cellule isolate sono state trasferite in una provetta da PCR contenente 10 µl di buffer (50 mmol/L KCL; 10 mmol/L Tris-HCL; pH 8,4; e gelatina all'0,01%) più 200 mg/ml di proteinasi K (Qiagen, Hilden, Germania), successivamente coperto con 50 µl di olio minerale ed incubato a 37° per 16 ore. Ai campioni è stato successivamente aggiunto tRNA da *Saccaromyces cerevisiae* in modo da aumentare l'affinità del DNA che è stato poi purificato su colonne Qiagen Spin Column (QIAamp DNA Microkit). Il DNA è stato infine eluito in 50 µl di acqua ultrapura e immediatamente amplificato in PCR.

## **2.7 Analisi di clonalità**

L'analisi della regione D-loop del DNA mitocondriale mediante il Neighbor Joining Method (NJ) e la costruzione di alberi filogenetici è stata utilizzata per l'analisi di clonalità (46). L'analisi della sequenza D-loop del DNA mitocondriale è stata effettuata amplificando due segmenti di circa 600bp che comprendono la regione

16045-16650 del DNA mitocondriale umano mediante due PCR; i primers utilizzati, disegnati utilizzando softwares dedicati, sono: per la regione 16045-60 (FW: 5'-ccaccaagtattgactcaccatcaa-3' e RW: 5'catggagagctcccgtgagtggttaat-3') e per la regione 16050-650 (FW: 5' ctccatgtacttggtatttcgtctgg-3' e RW: 5' gtttatggggtgatgtgagcccgtcta-3'), scelti in modo da evitare l'amplificazione di pseudogeni del DNA mitocondriale presenti nel genoma umano. Le reazioni di PCR sono effettuate alle seguenti condizioni: 4' a 95°C, 30'' a 95°C, 30'' a 57°C e 45'' a 72°C, per un totale di 40 cicli. I prodotti di PCR vengono risolti su gel di agarosio al 2% e, dopo purificazione, vengono sequenziati. I filamenti vengono screenati utilizzando i primers FW e RW. Le sequenze vengono comparate fra di loro e con una banca dati del DNA mitocondriale umano utilizzando il software di allineamento ClustalW. Le analisi filogenetiche e di cluster vengono poi effettuate utilizzando i software ClustalW e MEGA.

# RISULTATI

## 1. Studio dei pazienti che hanno sviluppato una LAM come tumore secondario

### 1.1 I casi clinici

Per lo studio del profilo genico del LH abbiamo attinto dalla casistica degli Istituti di Ematologia ed Oncologia Medica “L. e A. Seragnoli” e di Radioterapia “L. Galvani” dell’Università di Bologna. Si tratta in totale di 1256 pazienti giunti alla diagnosi di LH dal 1972 ad oggi, che hanno sviluppato in totale 121 seconde neoplasie maligne:

- 6 Leucemie Acute Mieloidi (LAM)
- 21 Linfomi non-Hodgkin
- 17 Carcinomi del polmone
- 9 Carcinomi della mammella
- 68 altri secondi tumori solidi (carcinomi gastrici, basoteliomi, tumori del Sistema Nervoso Centrale ecc.)

Il progetto è stato incentrato prima sui pazienti che hanno sviluppato come tumore secondario una LAM, un campione ridotto dal punto di vista numerico e quindi ottimale per mettere a punto l’approccio sperimentale; di seguito sono stati presi in considerazione i pazienti che hanno sviluppato un LNH come tumore secondario, questa volta il campione con maggiore incidenza della nostra casistica.

Data la scarsissima presenza delle cellule tumorali di Reed-Sternberg nei linfonodi neoplastici del LH (meno del 2%), è possibile assumere che dall’estrazione di DNA da biopsie linfoghiandolari “in toto” si ottiene un DNA genomico che è rappresentativo del genoma dell’intero individuo preso in considerazione. Mediante esperimenti preliminari, effettuati con la metodica dei CGH microarray, in cui è stato messo a confronto il DNA estratto dalla biopsia linfoghiandolare effettuata alla diagnosi di LH di nuovi pazienti in cura nell’Istituto di Ematologia “L. e A. Seragnoli” con il DNA dello stesso individuo proveniente da sangue periferico,

abbiamo potuto confermare la nostra ipotesi in quanto non sono state rilevate differenze sostanziali nei due DNA analizzati.

Dei sei pazienti che nella casistica hanno sviluppato una LAM secondaria al LH è stato possibile recuperare i blocchetti inclusi in paraffina effettuati alla diagnosi del primo tumore ed estrarre un DNA di buona qualità solamente di tre, che sono stati quindi inseriti nelle analisi eseguite, qui di seguito riportate.

Si tratta di 3 pazienti di età compresa fra 25 e 65 anni alla diagnosi del primo tumore; in tutti i casi a distanza di pochi anni dalla guarigione dal primo tumore si è osservata una LAM secondaria al LH.

L'incidenza cumulativa dell'insorgenza di LAM secondarie al LH varia dallo 0.8% al 6.3% ed è in genere limitata a 5-7 anni dal trattamento del primo tumore. Per quanto riguarda la nostra casistica, il tempo di insorgenza della LAM varia fra i 2 e i 6 anni (in media 4,3 anni) ed è inferiore rispetto a quanto riportato in letteratura (6,6 anni).

L'insorgenza di LAM secondarie è stata messa in correlazione all'utilizzo di protocolli di chemioterapia che includono farmaci alchilanti (in particolare la mechloretramina), presente nel protocollo MOPP (45).

Dei pazienti inclusi nel nostro studio, tutti sono stati trattati per il primo tumore con la chemioterapia; di questi, due sono stati trattati col protocollo MOPP, e uno solo dei pazienti è stato trattato con protocolli combinati di chemioterapia e radioterapia.

Per effettuare analisi sul genoma dei tre pazienti, ad ognuno di questi è stato associato un controllo, vale a dire un paziente di LH del tutto simile per sottotipo istologico di malattia, stadio clinico alla diagnosi e follow-up terapeutico eseguito, ma che non avesse sviluppato alcun secondo tumore.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti che hanno sviluppato LAM arruolati nel nostro studio e dei controlli ad essi associati sono riportate nelle tabelle seguenti.

A)

	<b>Paziente 1</b>	<b>Paziente 2</b>	<b>Paziente 3</b>
<b>Data di nascita</b>	14/02/1964	05/06/1932	14/10/1976
<b>Data I diagnosi</b>	01/03/1990	28/04/1997	18/06/2001
<b>LH classificazione istologica e stadio clinico alla diagnosi</b>	LH scleronodulare, stadio IVB polmone	LH inclassificabile, stadio III <sub>S</sub> B	LH scleronodulare, tipo I, stadio IIA, bulky mediastino
<b>Chemioterapia</b>	8 cicli MOPP/ABVD 4/90 1/91 →RC BEAM (ABMT) 2/91→RC	6 cicli VBM 5/97 11/97 3 cicli MOPP 1/98 3/98	6 cicli ABVD 7/01 12/01
<b>Radioterapia</b>		Linfonodi lomboaortici e milza 7/98 →RC	
<b>Data II diagnosi</b>	07/01/1995	29/08/2003	14/07/2003
<b>LAM Sottotipo morfologico e citogenetica</b>	Leucemia Acuta Mieloide M1 Cariotipo normale	Leucemia Acuta Mieloide M0-M1 Cariotipo normale	Leucemia Acuta Mieloide M3 t(15;17) del(7)(q22;q32) del(9)(q13;q31)
<b>Cura SNM</b>	Non disponibile	Osservazione fino al 1/2004 Etoposide 100mg HU 500mg dal 6/2/2004	ATRA+IDA (7/03 e 9/03) MTX+ATRA (11/03) ATRA+IDA (12/2003)
<b>Esito clinico</b>	† 01/04/1996	RC	RC

**B)**

	<b>Controllo 1</b>	<b>Controllo 2</b>	<b>Controllo 3</b>
<b>Data di nascita</b>	02/06/1970	22/05/1966	03/03/1975
<b>Data I diagnosi</b>	20/12/1990	10/01/2000	01/04/1999
<b>LH classificazione istologica e stadio clinico alla diagnosi</b>	LH scleronodulare stadio IIIA	LH scleronodulare tipo 2, stadio IV B polmone e milza	LH scleronodulare tipo 1, stadio II A, bulky mediastino
<b>Chemioterapia</b>	8 cicli MOPP/ABVD 1/'91-6/'91 →RC	6 cicli ABVD 2/'00-8/'00	4 cicli ABVD 6/'99-9/'99
<b>Radioterapia</b>		Linfonodi mediastinici, sovraclaveari e laterocervicali→RC	Linfonodi mediastinici, sovraclaveari e laterocervicali→RC

Tabella 1

Nel pannello A sono elencate le caratteristiche cliniche dei pazienti di LH che hanno sviluppato una LAM secondaria; nel pannello B invece sono elencate le caratteristiche cliniche dei Controlli, vale a dire i pazienti di LH arruolati nel nostro studio che non hanno sviluppato alcun secondo tumore.

## 1.2 Esperimenti di CGH microarray

L'obiettivo è stato quello di andare a verificare se, oltre all'influenza della terapia, vi siano alterazioni genomiche (in particolare amplificazioni e delezioni) associate all'insorgenza delle LAM secondarie al LH. Per fare questo è stata utilizzata la metodica dei CGH microarray, che permette di individuare la presenza di alterazioni strutturali, in particolare amplificazioni e delezioni, nei genomi dei pazienti presi in considerazione.

Per l'analisi dei genomi dei pazienti che hanno sviluppato una LAM secondaria al LH è stato individuato il seguente disegno sperimentale: è stato estratto il DNA dalle biopsie linfonodali incluse in paraffina effettuate alla diagnosi di LH dei 3 pazienti che hanno poi sviluppato la LAM secondaria e dei tre controlli, che non hanno sviluppato alcun secondo tumore.

L'analisi con i CGH microarray si è poi articolata in 3 fasi:

-è stato confrontato il DNA estratto dai linfonodi dei 3 pazienti che hanno sviluppato LAM con un pool del DNA estratto dai 3 controlli, che hanno sviluppato solo LH (in tabella indicato con LAM vs LH);

-è stato confrontato il DNA estratto dai 3 controlli con il DNA di un pool di linfoghiandole reattive (costituito da un insieme di 8 linfoghiandole provenienti da individui sani al fine di minimizzare le differenze individuali), in tabella indicato come LH vs LR.

-è stato confrontato il DNA dei 3 pazienti che hanno sviluppato la LAM con il pool di linfoghiandole reattive (in tabella indicato come LAM vs LR).

Di seguito sono riportati i geni che risultano amplificati o deleti nei campioni considerando come valore soglia una  $TRN \geq 1,2$  per definire le amplificazioni e  $\leq 0,83$  per le delezioni.

Dal confronto dei genomi dei pazienti che hanno sviluppato LAM con il pool di linfoghiandole reattive sono state evidenziate 44 amplificazioni e 28 delezioni: 24

delle 44 amplificazioni riscontrate risultano comuni a tutti e tre i pazienti, 12 risultano comuni in due dei tre pazienti, mentre le restanti 11 sono state riscontrate solamente in un paziente; per quanto riguarda le delezioni, da queste 28 ne abbiamo riscontrate 5 comuni a tutti a tre i pazienti, 12 condivise da due pazienti e le restanti 11 sono state rilevate solamente in un paziente.

E' interessante notare che la maggior parte delle alterazioni genomiche condivise da almeno due pazienti che hanno sviluppato la LAM secondaria sono state riscontrate anche nei pazienti di LH che non hanno sviluppato alcun secondo tumore messi a confronto con il pool di linfoghiandole reattive, a evidenziare che alterazioni genomiche sono presenti nei pazienti di LH rispetto ad individui sani indipendentemente dall'evoluzione di un secondo tumore. Queste alterazioni comprendono geni coinvolti nella stabilità genomica, in particolare delle regioni telomeriche dei cromosomi (16PTEL03, 20QTEL14, 6QTEL54, 8M16SP6, INS, EST CDY16, stSG42796), fattori di crescita e recettori ormonali (EGR1, ERBB2, FES, EGR2, ESR1), regolatori della progressione del ciclo cellulare (RB1, CDKN2A), regolatori dell'apoptosi (PTGS2/COX2), fattori coinvolti nella regolazione della struttura cromatinica (MLL) e nella trasduzione del segnale intracellulare (HRAS, MYCN, MYB, PIK3CA, MAPK2K5).

A)

Geni e regioni	Locus cromosomico	1	2	3
16PTEL03	16p tel	1.22	1.42	1.66
<b>20QTEL14</b>	20q tel	1.68	1.39	2.08
<b>6QTEL54</b>	6q tel	1.80	1.32	2.64
7QTEL20	7q tel	1.29	1.43	2.04
<b>8M16/SP6</b>	12p tel	1.50	1.46	2.68
ARHGAP8	22q13.3	1.33	1.26	1.33

ATM	11q22.3	1.24	1.26	2.12
CDC2L1(p58)	1p36	1.21	1.41	2.18
<b>D10S167</b>	10p11-10q11	1.26	1.26	2.03
<b>D13S25</b>	13q14.3	1.24	1.21	1.71
<b>D17S1670</b>	17q23	1.24	1.30	1.59
<b>EGR1</b>	5q31.1	1.57	1.46	1.99
<b>ELN</b>	7q11.23	1.47	1.59	2.46
<b>ERBB2 (HER-2)</b>	17q11.2-q12	1.59	1.28	1.71
<b>FES</b>	15q26.1	1.30	1.47	1.83
<b>GLI</b>	12q13.2- q13.3	1.32	1.27	1.21
<b>GSCL</b>	22q11.21	1.53	1.23	2.04
<b>HRAS</b>	11p15.5	2.57	1.70	3.09
<b>INS</b>	11p tel	1.30	3.00	2.68
<b>MYCN(N-myc)</b>	2p24.1	1.21	1.34	1.41
<b>PTGS2(COX2)</b>	1q31.1	1.58	1.28	2.33
<b>RB1</b>	13q14	1.39	1.30	1.61
<b>SNRPN</b>	15q12	1.21	1.53	2.01
<b>SRY</b>	Yp11.3	1.35	1.29	1.86
<b>D21S378</b>	21q11.2	1.35	1.18	1.26
<b>D5S23</b>	5p15.2	1.30	1.32	2.05
<b>D6S434</b>	6q16.3	1.33	1.05	1.84
<b>D2S447</b>	2q tel	1.88	2.54	1.06
ABL1	9q34.1	1.33	1.02	1.42
<b>D3S1274,ROBO1</b>	3p12-3p13	1.33	0.90	1.61
<b>DCC</b>	18q21.3	1.83	1.10	2.84
BRCA2	13q12-q13	1.23	0.95	1.24

<b>CDK6</b>	7q21-22	1.30	0.71	1.54
<b>E2F5</b>	8p22-q21.3	2.09	1.17	2.47
<b>PIM1</b>	6p21.2	1.62	1.09	1.85
<b>CSF1R</b>	5q33-35	1.08	1.31	1.25
<b>SGC34236</b>	2q13	1.11	1.44	2.09
<b>WHSC1</b>	4p16.3	1.10	1.23	1.54
<b>PDGFB(SIS)</b>	22q13.1	0.56	1.63	2.02
<b>OCRL1</b>	Xq25	0.85	1.24	1.30
<b>KAL</b>	Xp22.3	1.19	1.21	1.96
<b>IGH(SHGC-36156)</b>	14q tel	1.14	0.82	1.35
<b>D6S268</b>	6q16.3-q21	1.18	1.00	1.47
<b>D13S319</b>	13q14.2	1.08	1.10	2.09

B)

Geni e regioni	Locus cromosomico	1	2	3
<b>EGR2</b>	10q21.3	0.80	0.62	0.68
<b>ESR1</b>	6q25.1	0.73	0.81	0.66
<b>EST CDY16</b>	X/Yq tel	0.77	0.77	0.62
<b>MLL</b>	11q23	0.82	0.80	0.81
<b>PIK3CA</b>	3q26.3	0.81	0.69	0.67
<b>MAP2K5</b>	15q23	0.67	0.93	0.66
<b>RAF1</b>	3p25	0.81	1.02	0.75
<b>MYB</b>	6q22-q23	0.83	0.58	0.68
<b>ABCB1(MDR1)</b>	7q21.1	1.00	0.55	0.72

<b>CDKN 2A(p16)</b>	9p21	0.85	0.76	0.66
<b>CYP 24</b>	20q13.2	0.91	0.66	0.73
<b>D1S2465</b>	1p12	0.92	0.65	0.61
<b>ITGA4</b>	2q31-q32	0.91	0.62	0.76
<b>SHGC-182</b>	1q tel	1.17	0.57	0.69
<b>TGFB2</b>	1q41	0.90	0.79	0.73
stSG42796	19p tel	1.13	0.57	0.73
<b>TERC</b>	3q26	1.05	0.65	0.75
RASSF1	3p21.3	0.78	1.49	0.96
<b>IGH</b>	14q tel-2	1.14	0.82	1.35
DAB2	5p13	0.98	0.67	0.91
<b>KAI1</b>	11p11.2	0.94	0.83	0.67
<b>BCL2 3'</b>	18q21.3	0.92	0.83	0.65
<b>D19S238E</b>	19q tel	1.00	0.93	0.77
<b>LPL</b>	8p22	0.94	0.89	0.65
TCL1A	14q32.1	0.88	0.99	0.81
ABCC1(MRP1)	16p13.1	0.88	0.95	0.72
D6S311	6p23-24	0.94	0.87	0.81
TK1	17q23.2q25.3	0.98	0.90	0.75

Tabella 2

Alterazioni genomiche (amplificazioni: pannello A e delezioni: pannello B) rilevate nei tre pazienti di LH che hanno sviluppato una LAM secondaria (test) messi a confronto con individui sani (reference). In tabella sono riportate in sequenza le alterazioni riscontrate in 3, 2 o solamente 1 paziente di LH; i caratteri in grassetto contraddistinguono geni o regioni condivisi da almeno 2 dei 3 pazienti di LH comparabili per sottotipo istologico, stadio clinico alla diagnosi e follow-up che non hanno sviluppato alcun secondo tumore (controlli)

A)

Geni e regioni	4	5	6
16PTEL03	1.14	1.35	1.01
<b>20QTEL14</b>	1.12	3.08	1.87
<b>6QTEL54</b>	1.09	3.55	1.87
7QTEL20	1.04	1.70	1.03
<b>8M16/SP6</b>	1.11	3.46	1.97
ARHGAP8	0.95	1.21	0.96
ATM	1.16	2.81	1.06
CDC2L1(p58)	1.11	1.62	1.15
<b>D10S167</b>	1.09	1.73	1.24
<b>D13S25</b>	1.45	1.61	2.77
<b>D17S1670</b>	0.92	2.20	1.36
<b>EGR1</b>	1.69	2.64	1.23
<b>ELN</b>	1.49	2.51	1.26
<b>ERBB2 (HER-2)</b>	1.08	2.29	1.54
<b>FES</b>	1.64	1.78	2.32
<b>GLI</b>	1.13	1.40	1.24
<b>GSCL</b>	1.08	2.56	1.45
<b>HRAS</b>	1.35	4.43	2.75
<b>INS</b>	1.34	3.87	2.35
<b>MYCN(N-myc)</b>	1.29	1.50	1.75
<b>PTGS2(COX2)</b>	1.03	2.61	1.82
<b>RB1</b>	1.00	2.15	1.61
<b>SNRPN</b>	1.20	2.20	1.43
<b>SRY</b>	1.07	1.95	1.33
<b>D21S378</b>	1.41	1.73	2.59

<b>D5S23</b>	1.07	3.14	1.40
<b>D6S434</b>	1.29	2.22	2.23
<b>D2S447</b>	4.08	0.96	2.74
ABL1	0.98	1.75	1.03
<b>D3S1274,ROBO1</b>	1.01	2.54	1.31
<b>DCC</b>	-	4.45	1.63
BRCA2	0.84	1.51	0.92
<b>CDK6</b>	0.92	1.86	1.29
<b>E2F5</b>	1.09	4.08	2.29
<b>PIM1</b>	1.17	2.95	1.66
<b>CSF1R</b>	1.38	1.54	1.77
<b>SGC34236</b>	1.21	2.43	1.31
<b>WHSC1</b>	1.25	1.53	2.17
<b>PDGFB(SIS)</b>	1.24	1.56	1.13
OCRL1	1.16	0.95	1.36
<b>KAL</b>	0.89	2.46	1.50
<b>IGH(SHGC-36156)</b>	0.84	1.93	1.23
<b>D6S268</b>	1.10	1.79	1.28
<b>D13S319</b>	0.90	2.42	1.28
AFM217YD10	1.36	1.66	1.88
FGR(SRC2)	1.44	1.29	2.20
GATA3	1.09	1.88	1.36
TOP1	1.61	1.98	2.51
WT1	1.80	1.91	2.52
DRIM, ARL1	1.21	1.28	1.31
TBR1	1.35	1.24	1.58

B)

Geni e regioni	4	5	6
<b>EGR2</b>	0.78	0.66	0.57
<b>ESR1</b>	0.78	0.72	0.64
<b>EST CDY16</b>	0.69	0.70	0.53
<b>MLL</b>	0.79	0.78	0.41
<b>PIK3CA</b>	0.66	0.94	0.38
<b>MAP2K5</b>	0.76	0.68	0.55
RAF1	1.07	0.78	0.86
<b>MYB</b>	0.84	0.67	0.53
<b>ABCB1(MDR1)</b>	0.82	0.63	0.46
<b>CDKN 2A(p16)</b>	0.71	0.67	0.55
<b>CYP 24</b>	0.80	0.66	0.46
<b>D1S2465</b>	0.72	0.61	0.53
<b>ITGA4</b>	0.81	0.74	0.73
<b>SHGC-182</b>	0.68	0.60	0.42
<b>TGFB2</b>	0.81	0.75	0.63
stSG42796	0.83	0.90	0.76
<b>TERC</b>	0.99	0.72	0.65
RASSF1	1.21	0.50	0.94
<b>IGH</b>	0.86	0.63	0.56
DAB2	0.87	0.85	0.62
<b>KAI1</b>	0.90	0.79	0.49
<b>BCL2 3'</b>	0.79	0.62	0.47
<b>D19S238E</b>	1.01	0.69	0.79
<b>LPL</b>	0.77	0.68	0.64
TCL1A	0.97	0.70	0.83
<b>ABCC1(MRP1)</b>	1.12	0.70	0.96

D6S311	1.08	0.78	1.02
TK1	0.91	0.85	0.59

Tabella 3

Alterazioni genomiche (amplificazioni: pannello A e delezioni: pannello B) rilevate nei tre pazienti di LH che non hanno sviluppato alcuna neoplasia secondaria al LH (test) messi a confronto con individui sani (reference). I caratteri in grassetto contraddistinguono geni e regioni che risultano alterati in almeno 2 dei 3 pazienti presi in considerazione.

Di seguito sono stati messi a confronto i genomi dei pazienti che hanno sviluppato la LAM secondaria al LH (test) con i genomi uniti in un pool dei controlli, che non hanno sviluppato alcun secondo tumore (reference), per mettere in evidenza le alterazioni genomiche associate alla leucemogenesi secondaria.

Le alterazioni genomiche individuate, riportate nella tabella 3, mettono in evidenza la presenza di variabilità genomica individuale nei tre pazienti ed in tutti i casi riguardano geni e regioni che risultano alterati anche dal confronto fra il DNA estratto dal primo tumore con quello estratto da individui sani. Solamente nel paziente 3, l'unico che presenta alterazioni cariotipiche complesse nei progenitori ematopoietici leucemici alla diagnosi di LAM, il numero di alterazioni riscontrate risulta largamente superiore a quello degli altri due pazienti. Le alterazioni genomiche individuate, che risultano comuni a tutti i 3 pazienti, sono riportate separatamente in tabella 4: queste comprendono 3 amplificazioni (che riguardano geni e regioni che non risultano invece alterati nel confronto con i genomi di individui sani) e 5 delezioni (che rappresentano in realtà la presenza di un copy

number inferiore di questi geni nei pazienti che sviluppano LAM rispetto ai controlli, che messi a confronto con individui sani presentano questi geni come amplificati).

A)

Geni e regioni	1	2	3
6QTEL54	0.81	0.88	<b>1.41</b>
7QTEL20	0.91	<b>1.23</b>	<b>1.38</b>
8M16/SP6	0.79	0.89	<b>1.28</b>
ATM	0.96	0.93	<b>1.59</b>
CDC2L1(p58)	0.75	0.91	<b>1.31</b>
D10S167	0.87	1.02	<b>1.34</b>
D17S1670	0.81	0.99	<b>1.21</b>
EGR1	0.80	0.87	<b>1.25</b>
ELN	0.74	0.97	<b>1.39</b>
ERBB2 (HER-2)	0.86	1.07	<b>1.35</b>
GSCL	1.01	1.04	<b>1.44</b>
HRAS	<b>4.73</b>	1.01	1.08
INS	0.85	1.28	<b>1.35</b>
PTGS2(COX2)	1.05	0.96	<b>1.72</b>
RB1	0.93	0.95	<b>1.47</b>
SNRPN	0.92	0.93	<b>1.78</b>
SRY	0.79	0.83	<b>1.22</b>
D21S378	0.87	0.68	<b>1.21</b>
D5S23	1.08	0.99	<b>1.64</b>
D3S1274,ROBO1	1.00	0.87	<b>1.53</b>
CDK6	1.01	0.99	<b>1.51</b>
E2F5	0.79	0.92	<b>1.32</b>
PIM1	0.89	0.94	<b>1.36</b>

SGC34236	0.81	0.96	<b>1.37</b>
IGH(SHGC-36156)	1.04	0.92	<b>1.21</b>
D6S268	0.88	0.89	<b>1.24</b>
D13S319	0.86	0.99	<b>1.57</b>

B)

Geni e regioni	1	2	3
EGR2	1.28	<b>0.79</b>	<b>0.61</b>
ESR1	1.08	<b>0.76</b>	<b>0.58</b>
EST CDY16	1.31	<b>0.81</b>	<b>0.69</b>
MAP2K5	1.18	0.96	<b>0.60</b>
CDKN 2A(p16)	1.26	<b>0.80</b>	0.84
CYP 24	1.32	0.94	<b>0.81</b>
D1S2465	1.14	0.86	<b>0.50</b>
TGFB2	1.05	0.96	<b>0.70</b>
BCL2 3'	1.11	1.12	<b>0.81</b>
LPL	1.03	1.06	<b>0.81</b>
ABCC1(MRP1)	0.99	1.18	<b>0.73</b>
D6S311	0.89	0.88	<b>0.78</b>

Tabella 4

Alterazioni genomiche (amplificazioni: pannello A e delezioni: pannello B) rilevate nei tre pazienti di LH che hanno sviluppato una LAM secondaria (test) messi a confronto con pazienti di LH che non hanno sviluppato alcuna seconda neoplasia (reference). I caratteri in grassetto contraddistinguono geni e regioni che risultano alterati nei singoli pazienti presi in considerazione.

A

	Locus cromosomico	1	2	3
AFM137XA11	9p11.2	1.67	1.24	1.59
FGFR1	8p11.2-p11.1	1.22	1.29	1.30
PPARBP	17q12	1.37	1.38	1.21

B)

	Locus cromosomico	1	2	3
AFM217YD10	17q tel	0.65	0.72	0.66
FGR(SRC2)	1p36.2-p36.1	0.56	0.81	0.66
GATA3	10p15	0.75	0.79	0.61
TOP1	20q12-q13.1	0.64	0.65	0.72
WT1	11p13	0.59	0.69	0.68

Tabella 5

Alterazioni genomiche (amplificazioni: pannello A e delezioni: pannello B) che risultano comuni nei 3 pazienti di LH che hanno sviluppato una LAM secondaria (test) messi a confronto con pazienti di LH che non hanno sviluppato alcuna seconda neoplasia (reference).

### **1.3 Validazione dei risultati di CGH microarray**

#### **Validazione mediante FISH**

Per la validazione dei risultati ottenuti con la metodica dei CGH microarray è stata utilizzata la metodica di ibridizzazione in situ (FISH), con sonde specifiche marcate direttamente per incorporazione di precursori nucleotidici fluorescinati per i geni che hanno mostrato alterazioni strutturali. Nel nostro caso, sulla base dei risultati dei CGH microarray, si è scelto di osservare con l'ibridazione in situ i geni p16 e N-myc: entrambi questi geni risultano alterati nel confronto dei genomi dei pazienti di LH con linfoghiandole reattive, indipendentemente quindi dall'insorgenza di un secondo tumore, con N-myc che risulta amplificato e p16 che risulta deleto. L'analisi di FISH è stata quindi eseguita sui 3 pazienti di LH che hanno sviluppato la LAM secondaria, sui 3 pazienti che hanno sviluppato solamente il LH e su un individuo sano come controllo. Nella tabella qui di seguito riportata sono elencate per ogni campione, per quanto riguarda il gene n-Myc, le percentuali di nuclei riscontrati che presentano un numero di segnali maggiore rispetto al gene di riferimento cep2, mentre per quanto riguarda il gene p16 le percentuali di nuclei riscontrati che presentano un numero di segnali inferiori rispetto al gene di riferimento cep9.

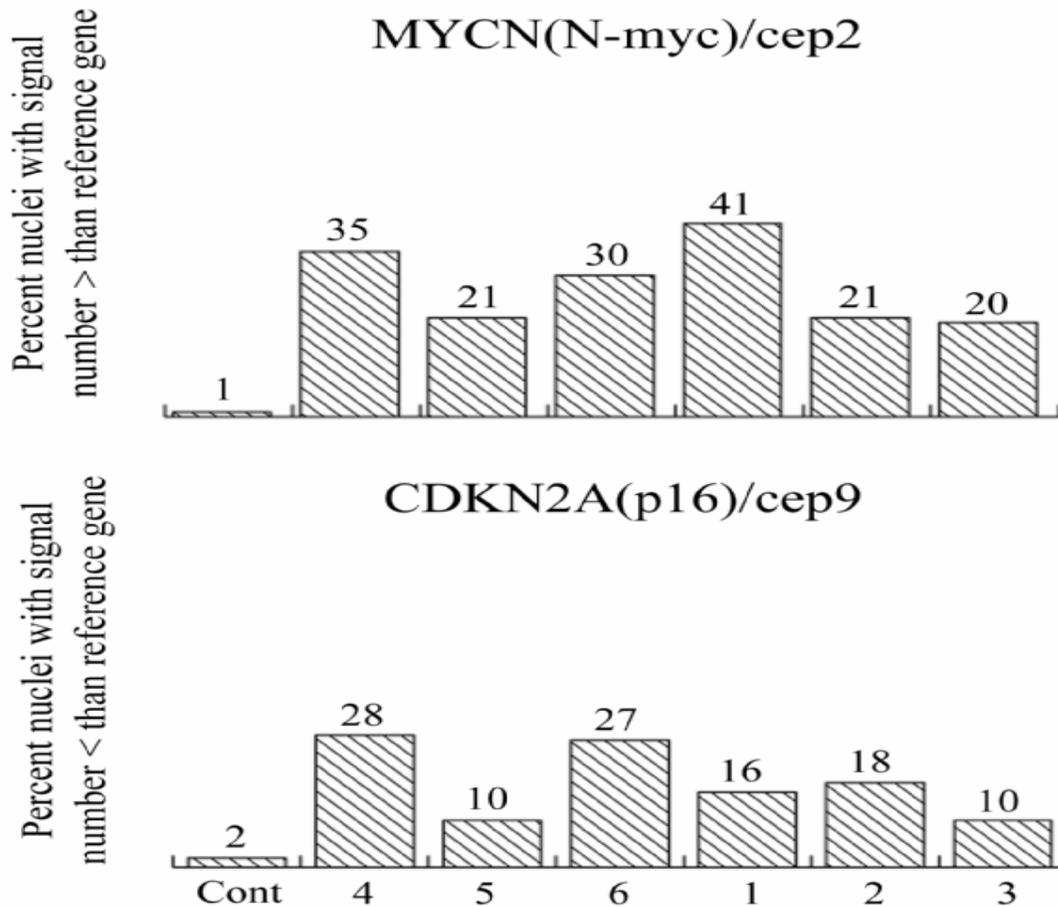


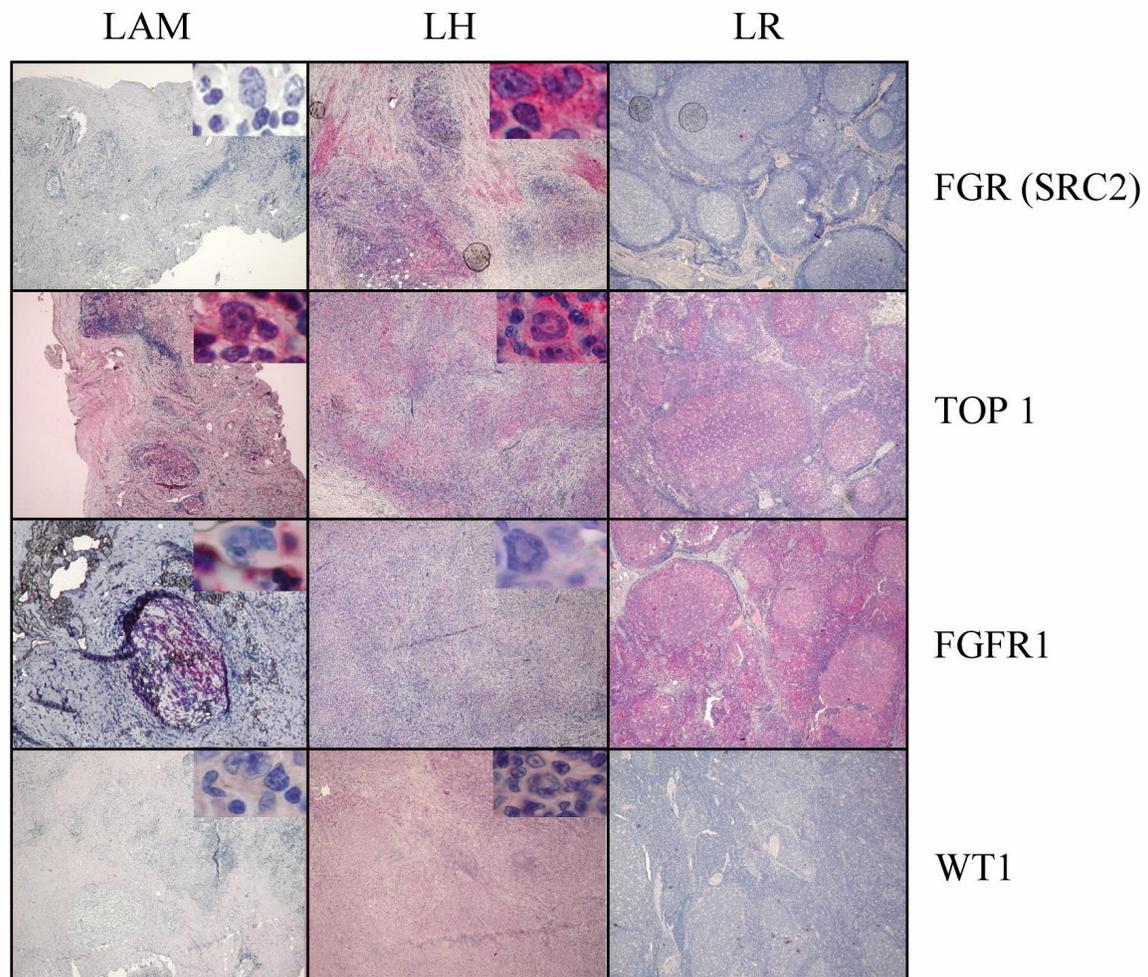
Tabella 6

Risultati degli esperimenti di FISH effettuati per la validazione dei CGH-microarray sui geni MYCN (N-Myc) e CDKN2A (p16). L'analisi di FISH è stata effettuata su sezioni provenienti da biopsie linfonodali provenienti da individui sani (qui in tabella sono rappresentati i valori relativi a uno di questi, designato come Cont), dai tre pazienti di LH che hanno sviluppato la LAM secondaria (rappresentati in tabella dai numeri 1-3) e dai tre controlli che hanno sviluppato solamente il LH (rappresentati in tabella dai numeri 4-6).

### Validazione mediante indagine immunocistochimica

Per la validazione dei dati ottenuti dagli esperimenti di CGH microarray sono state effettuati anche esperimenti di immunocistochimica, che permettono di andare a verificare in situ l'espressione proteica dei geni che presentano alterazioni genomiche

strutturali; inoltre mediante immunohistochimica è possibile anche distinguere i livelli di espressione della proteina direttamente sulle cellule tumorali di Reed-Sternberg da quelli delle cellule circostanti, che nel caso del LH rappresentano una componente cellulare reattiva, non considerata di tipo tumorale. In particolare, sono stati confermati con questa indagine i dati relativi ai geni FGFR1, FGR(SRC2), TOP1 e WT1, che risultano alterati dal confronto dei genomi dei pazienti che hanno sviluppato la LAM con quelli dei pazienti che hanno sviluppato solamente il primo tumore. Per quanto riguarda invece i geni PPARBP e GATA3, non è stato possibile confermare il dato della loro alterazione riscontrato con l'analisi dei CGH microarray a causa di un'inadeguata specificità dell'anticorpo utilizzato per l'analisi immunohistochimica. Ognuno di questi geni è stato analizzato su sezioni di tessuto linfoghiandolare proveniente dal paziente, dal relativo controllo (che ha sviluppato solamente il primo tumore) e da un controllo proveniente da un individuo sano che presenta quindi una componente cellulare interamente di tipo reattivo. Nella tabella seguente sono rappresentati i dati dell'indagine immunohistochimica relativi ad un solo paziente; per gli altri due non sono state comunque riscontrate differenze significative. Per quanto riguarda la distinzione dell'espressione genica nelle cellule di Reed-Sternberg dalla componente cellulare reattiva circostante, per i geni FGR(SRC2) e TOP1 non si riscontrano differenze significative nei livelli di espressione, mentre per i geni FGFR1 e WT1 viene evidenziata nei pazienti che hanno sviluppato la LAM secondaria al LH una mancanza di espressione a livello delle cellule di Reed-Sternberg, a differenza della componente cellulare circostante non neoplastica, dove è visibile la presenza della proteina.



**Tabella 7**

Validazione dei risultati di CGH-microarray mediante immunohistochimica.

Risultati degli esperimenti di immunohistochimica effettuati su sezioni provenienti da biopsie di individui sani (in tabella designati con LR), pazienti che hanno sviluppato la LAM come tumore secondario (in tabella designati con LAM) e pazienti che hanno sviluppato solamente LH (in tabella designati con LH). I pannelli mostrano solamente alcune immagini significative di un soggetto per gruppo, relative all'immunohistochimica effettuata per i geni FGR (SRC2), TOP1, FGFR1 e WT1).

## **2. Studio dei pazienti che hanno sviluppato un LNH come tumore secondario**

### **2.1 I casi clinici**

Dei 21 pazienti che nella casistica hanno sviluppato un LNH secondario al LH è stato possibile recuperare i blocchetti inclusi in paraffina effettuati alla diagnosi del primo tumore ed estrarre un DNA di buona qualità solamente di 10, le cui caratteristiche cliniche sono riportate nelle tabelle seguenti.

Si tratta di 10 pazienti che hanno sviluppato il primo tumore ad un'età compresa fra 22 e 55 anni; in tutti i casi a distanza di alcuni anni dalla guarigione dal primo tumore è stato diagnosticato un LNH secondario al LH.

L'incidenza cumulativa dell'insorgenza di LNH secondari al LH si attesta su 8%, ed avviene in genere abbastanza tardivamente. Per quanto riguarda la nostra casistica, i LNH risultano, con un'incidenza del 17%, i tumori secondari più frequenti dopo la guarigione dal LH; il tempo di insorgenza del LNH varia fra 1 e 16 anni (in media 8,8) ed è inferiore rispetto a quanto riportato in letteratura (12 anni).

L'insorgenza di LNH secondari, come degli altri tumori solidi, è stata messa in correlazione all'utilizzo della radioterapia per il trattamento del primo tumore. Nella nostra casistica, 8 pazienti sono stati trattati con protocolli combinati di chemio-radioterapia e tutti hanno comunque subito un trattamento con la radioterapia.

Per effettuare analisi sul genoma di questi pazienti, in questo caso è stato possibile raccogliere i blocchetti inclusi in paraffina effettuati alla diagnosi sia del primo che del secondo tumore.

	<b>Paziente 1</b>	<b>Paziente 2</b>	<b>Paziente 3</b>	<b>Paziente 4</b>	<b>Paziente 5</b>
<b>Data di nascita</b>	18/04/1926	28/12/1946	31/03/1965	12/04/1968	13/03/1963
<b>Data I diagnosi</b>	01/08/1981	01/04/1979	01/01/1990	01/05/1993	01/10/1985
<b>LH</b> <b>classificazione</b> <b>istologica e</b> <b>stadio clinico</b> <b>alla diagnosi</b>	LH Cellularità mista stadio IIIB	LH Scleronodulare Stadio IVB	LH Scleronodulare Stadio IVB	LH Scleronodulare Stadio IIIA	LH Scleronodulare Stadio IIIB
<b>Chemioterapia</b>	9 cicli MOPP/ABVD	11 cicli MOPP/ABVD	8 cicli MOPP/ABVD+ CEP+IEV	4 cicli ABVD + 2 cicli MOPP+ ABMT	3 cicli MOPP/ABVD + EDX, Velbe, BCNU+6 cicli CEP
<b>Radioterapia</b>	Cavo orbitario DX	RT Mantellare + mediastinica	Barra L-A	Mediastino, sovraclav., lomboart., milza	RT
<b>Data II</b> <b>diagnosi</b>	01/11/1993	05/03/1990	11/10/1994	29/06/1994	09/01/1998
<b>LNH</b> <b>classificazione</b> <b>istologica e</b> <b>stadio clinico</b> <b>alla diagnosi</b>	LNH	ALCL Hodgkin- related	ALCL Hodgkin- related	ALCL	NHL
<b>Terapia</b>		Cb terapia	3 cicli IEV+ RT	2 cicli CEP+ RT	
<b>Esito clinico</b>	† 30/04/96	† 2003	Remissione	Remissione	† 15/02/98

	<b>Paziente 6</b>	<b>Paziente 7</b>	<b>Paziente 8</b>	<b>Paziente 9</b>	<b>Paziente10</b>
<b>Data di nascita</b>	10/02/1969	13/12/1962	24/04/1950	31/10/1941	08/08/1965
<b>Data di I diagnosi</b>	01/05/1991	01/11/1984	01/11/1984	01/12/1989	01/12/1989
<b>HL classificazione istologica e stadio clinico alla diagnosi</b>	LH scleronodulare, stadio IIIA bulky mediastino	LH scleronodulare, stadio IIA bulky mediastinico	LH scleronodulare, stadio IA	LH scleronodulare, stadio IIIA	LH cellularità mista stadio IIIB
<b>Chemioterapia</b>	8 cicli MOPP/ABVD+ CEP	4 cicli MOPP/MVPP +ABVD			8 cicli MOPP/ABVD+ MOPP
<b>Radioterapia</b>	RT	M+ Ascella e regione costale dx	RT M	RT sub-totale- nodale	RT
<b>Data di II diagnosi</b>	08/01/1997	01/05/94	01/05/99	01/12/91	01/11/93
<b>LNH classificazione istologica e stadio clinico alla diagnosi</b>	LNH	ALCL CD30+ Stadio IV	LNH	IC Stadio IVM	ALCL
<b>Terapia</b>		VELBE/EDX/ NATULAN+ RT+ 4 cicli CEP		Nessuna terapia	MACOP-B+ RT
<b>Esito clinico</b>	† 25/01/04	† 13/02/97	† 16/03/02	Remissione	† 16/03/02

## Tabella 8

Caratteristiche cliniche dei pazienti di LH che hanno sviluppato come tumore secondario un Linfoma non-Hodgkin.

### **2.2 Esperimenti di CGH microarray**

L'obiettivo anche in questo caso è stato quello di andare a verificare se, oltre all'influenza della terapia, vi siano alterazioni genomiche (in particolare amplificazioni e delezioni) associate all'insorgenza delle LNH secondari al LH. Per fare questo è stata utilizzata la metodica dei CGH microarray, che permette di individuare la presenza di alterazioni strutturali, in particolare amplificazioni e delezioni, nei genomi dei pazienti presi in considerazione.

Per l'analisi dei genomi dei pazienti che hanno sviluppato un LNH secondario al LH è stato individuato il seguente disegno sperimentale: è stato estratto il DNA dalle biopsie linfonodali incluse in paraffina effettuate alla diagnosi di LH e di LNH dello stesso paziente; l'analisi con i CGH microarray si è poi articolata in 3 fasi:

-per ogni paziente è stato confrontato il DNA estratto alla diagnosi di LNH con il DNA dello stesso estratto dal blocchetto effettuato alla diagnosi del LH (in tabella indicato con LNH vs LH);

-è stato confrontato il DNA estratto dai 10 pazienti alla diagnosi di LH con il DNA di un pool di linfoghiandole reattive (costituito da un insieme di 8 linfoghiandole provenienti da individui sani al fine di minimizzare le differenze individuali), in tabella indicato come LH vs LR.

-è stato confrontato il DNA dei 10 pazienti che hanno sviluppato LNH con il pool di linfoghiandole reattive (in tabella indicato come LNH vs LR).

Di seguito sono riportati solamente i geni che risultano alterati in comune a tutti i pazienti presi in considerazione, dopo avere sottoposto i risultati dei singoli esperimenti di CGH-microarray ad analisi statistica mediante t-test e correzione di Bonferroni.

Confrontando il DNA genomico dei pazienti estratto dalla biopsia effettuata alla diagnosi del primo tumore con il pool di linfoghiandole reattive sono state rilevate 15 amplificazioni e 16 delezioni che risultano significative dall'analisi dei risultati di CGH-microarray dei 10 pazienti considerati nel nostro disegno sperimentale.

A)  
AMPLIFICAZIONI

	Locus cromosomico	Ratio
129F16/SP6	19p tel	2.49
TERC	3q26	2.19
PDGRL	8p22-p21.3	2.03
PRKCZ	1p36.33	1.92
SOX22	20p tel	1.88
U32389	2p tel	1.87
AKT3	1q44	1.81
BCR	22q11.23	1.77
ESR1	6q25.1	1.68
BMI1	10p13	1.63
MLL	11q23	1.60
NRAS	1p13.2	1.53
STS5'	Xp22.3	1.53
DMD exon 45-51	Xp21.1	1.52
CCNE1	19q12	1.37

B)  
DELEZIONI

	Locus cromosomico	Ratio
D11S461	11q12.2	0.73
VHL	3p25-p26	0.72
ABCC1(MRP1)	16p13.1	0.69
GS10K2/T7	4p tel	0.68
WI-5214	15q tel	0.66
MOS	8q11	0.65
ARHGAP8	22q13.3	0.62
D8S504	8p tel	0.62
SGC34236	2q13	0.60
PPARBP(PBP)	17q12	0.58
PTCH	9q22.3	0.56
GLI	12q13.2- q13.3	0.53
SRY	Yp11.3	0.52
FES	15q26.1	0.52
TK1	17q23.2- q25.3	0.50
TGFB2	1q41	0.43

Tabella 9

Alterazioni genomiche (amplificazioni: pannello A e delezioni: pannello B) che risultano comuni nei 10 pazienti di LH che hanno sviluppato un LNH secondario (test) messi a confronto con un pool di linfoghiandole reattive (reference).

Dal confronto del DNA genomico dei pazienti estratto dalla biopsia effettuata alla diagnosi del tumore secondario con il pool di linfoghiandole reattive sono state

rilevate invece 3 amplificazioni e 7 delezioni che risultano significative dall'analisi statistica dei risultati relativi ai 10 pazienti che abbiamo inserito negli esperimenti di CGH microarray.

#### AMPLIFICAZIONI:

	Locus cromosomico	Valore Medio
CEB108/T7	1p tel	1.46
FES	15q26.1	1.33
SRY	Yp11.3	1.26

#### DELEZIONI:

	Locus cromosomico	Ratio
PACE4C	15q tel	0.80
PTPN1	20q13.1-q13.2	0.79
TP63	3q27-q29	0.78
CCNE1	19q12	0.78
PAI-1	7q21.3-q22	0.77
ESR1	6q25.1	0.72
D1S2465,D1S3 402	1p12	0.67

#### **Tabella 10**

Alterazioni genomiche ( amplificazioni: pannello A e delezioni: pannello B) che risultano comuni nei 10 pazienti di LH che hanno sviluppato un LNH, riscontrate alla diagnosi del tumore secondario (test) messi a confronto con un pool di linfoghiandole reattive (reference).

Confrontando infine i genomi dei pazienti estratti dalla biopsia effettuata alla diagnosi del tumore secondario con i genomi degli stessi pazienti estratti dalla biopsia effettuata alla diagnosi del primo tumore sono state rilevate solamente 3 amplificazioni e 7 delezioni comuni a tutti i pazienti; è importante notare che queste alterazioni strutturali non dovrebbero essere qui elencate secondo i canoni prestabiliti (si considerano come valori soglia una TRN  $\geq 1,2$  per definire le amplificazioni e  $\leq 0,83$  per le delezioni) ma abbiamo considerato comunque queste alterazioni come significative poiché comuni a tutti i pazienti inseriti negli esperimenti di CGH microarray e validate dalle analisi statistiche eseguite. Dall'analisi di questi risultati risulta comunque evidente come vi sia una corrispondenza molto stretta dai genomi degli stessi pazienti "fotografati" alla diagnosi del tumore primario e in seguito alla diagnosi del tumore secondario.

#### AMPLIFICAZIONI:

	Locus cromosomico	Ratio
NIB1408	5q tel	1.26
WNT1(INT1)	12q12-q13	1.15
IGF1R	15q25-q26	1.13
D9S913	9p tel	1.12
D11S461	11q12.2	1.07
10QTEL24	10q tel	1.09

#### DELEZIONI:

	Locus cromosomico	Ratio
1QTEL10	1q tel	0.90

Tabella 11

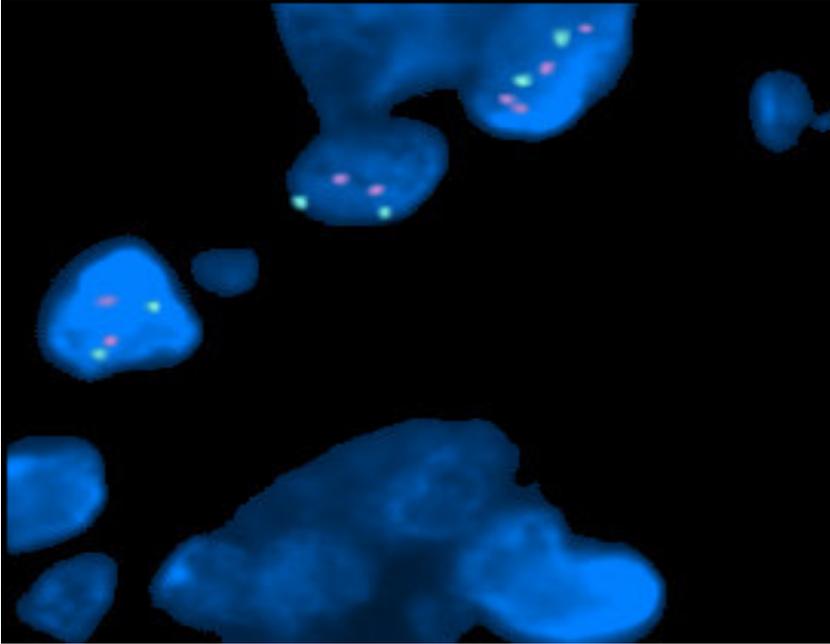
Alterazioni genomiche (amplificazioni: pannello A e delezioni: pannello B) che risultano comuni nei 10 pazienti di LH che hanno sviluppato un LNH, riscontrate alla diagnosi del tumore secondario (test) messi a confronto con le rispettive diagnosi del tumore primario (reference).

### **2.3 Validazione dei risultati di CGH-microarray**

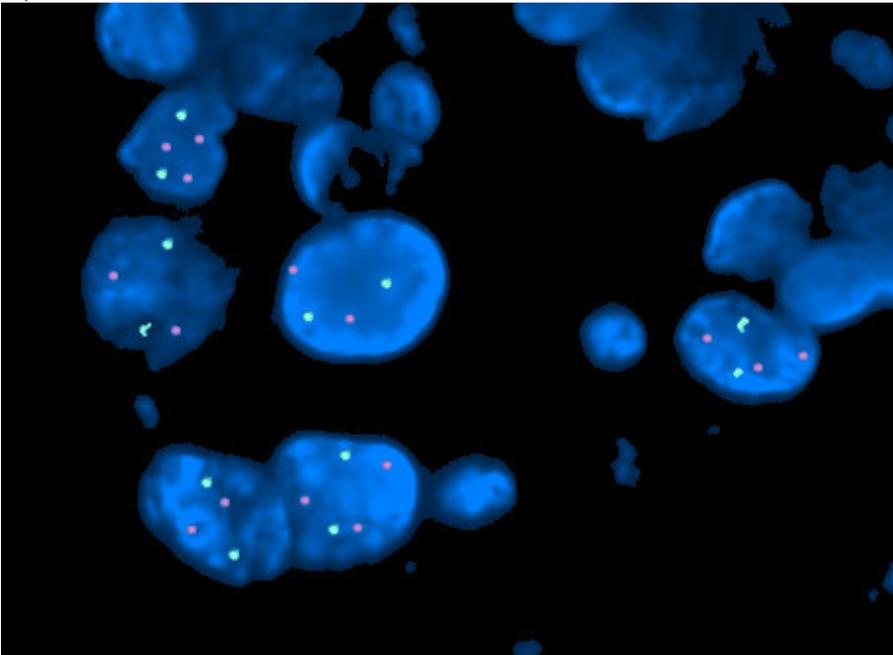
#### **Validazione mediante FISH**

Per la validazione dei risultati ottenuti con la metodica dei CGH microarray è stata utilizzata la metodica di ibridizzazione in situ (FISH), con sonde specifiche marcate direttamente per incorporazione di precursori nucleotidici fluorescinati per i geni che hanno mostrato alterazioni strutturali. Nel nostro caso, sulla base dei risultati dei CGH microarray, si è scelto di osservare con l'ibridazione in situ il gene N-myc, che risulta amplificato dal confronto dei genomi di alcuni dei pazienti di LH con linfoghiandole reattive. L'analisi di FISH è stata quindi eseguita su 5 pazienti nel vetrino allestito a partire dalla biopsia effettuata alla diagnosi di LH, in quelli allestiti a partire dalle biopsie effettuate alla diagnosi di LNH e su un individuo sano come controllo. Anche in questo caso la metodica di FISH ha confermato i risultati ottenuti dalle analisi genomiche effettuate con la metodica dei CGH-microarray.

A)



B)



C)

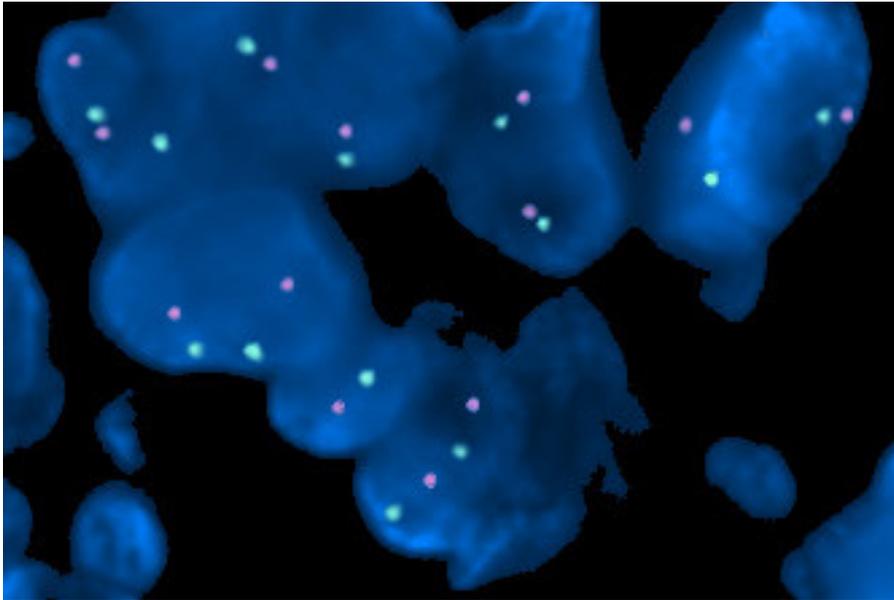


Figura 9

Analisi di FISH per il gene N-Myc effettuata su vetrini allestiti a partire dalle diagnosi di LH (pannello A), dalle diagnosi degli stessi pazienti di LNH (pannello B) e da un individuo sano (pannello C). La sonda utilizzata per N-myc è LSI N-myc emette fluorescenza rossa e ibridizza a livello della regione 2p23-24 del cromosoma 2, come controllo è stata utilizzata la sonda Cep2, che ibridizza a livello della regione cromosomica centromerica ed emette fluorescenza verde.

#### **2.4 Analisi di clonalità**

La corrispondenza molto stretta fra il DNA genomico degli stessi pazienti estratto alla diagnosi del primo tumore (LH) e del secondo tumore (LNH) e la comunanza fra i due tumori, oltre che del tessuto di insorgenza, anche della componente cellulare trasformata (nella maggior parte dei casi linfociti B del centro germinativo) ci hanno indotto ad effettuare un'analisi di clonalità fra i due tumori. Le ipotesi alternative che si ponevano erano quelle di un'insorgenza dei due tumori da uno stesso progenitore clonale, la cui espressione clinica possa essere dilazionata nel tempo, oppure quella

dei due tumori come due entità cliniche separate e derivanti da due progenitori geneticamente instabili ma diversi (nel qual caso potrebbe essere molto rilevante il ruolo del trattamento chemio-radioterapico effettuato per il primo tumore nell'indurre double-strand breaks (DSB) che, se impropriamente riparati, possono favorire l'insorgenza del nuovo clone tumorale caratteristico del LNH).

A tal proposito è stata utilizzata come metodica per l'individuazione di clonalità fra i due tumori l'analisi della regione D-loop del DNA mitocondriale mediante il Neighbor Joining Method (NJ) e la costruzione di alberi filogenetici: questa tipologia di analisi di clonalità permette di misurare, in base alle diversità di sequenza della regione ipervariabile D-loop del DNA mitocondriale, la "distanza genetica" fra i DNA estratti a partire dai due tumori.

Sono state quindi prelevate le popolazioni cellulari di interesse dai rispettivi vetrini colorati con ematossilina-eosina mediante microdissezione-laser: dai vetrini allestiti a partire dalle biopsie effettuate alla diagnosi di LH sono state prelevate singole cellule di Reed-Sternberg (almeno 200 da ogni vetrino per ottenere un quantitativo di DNA estraibile mediante le metodiche classiche di biologia molecolare), mentre da quelli allestiti a partire dalle biopsie effettuate alla diagnosi di LNH sono state prelevate, con l'aiuto di metodiche di immunistochemical che andassero a evidenziare marcatori specifici del LNH, le zone di tessuto tumorale. Per ogni paziente è stato estratto anche un DNA di controllo: per i 3 pazienti tutt'ora viventi è stato possibile richiamarli per un prelievo ematochimico presso l'Istituto di Ematologia "L. e A. Seragoli", da cui poi è stato estratto il DNA genomico; per i restanti pazienti, tutti deceduti in seguito al secondo tumore, sono state prelevate, sempre mediante microdissezione-laser, porzioni di tessuto non tumorali dai vetrini allestiti a partire dalle biopsie effettuate alla diagnosi di LH.

Dai DNA estratti a partire dalle tre popolazioni cellulari selezionate è stata sequenziata per ogni paziente la regione D-loop del DNA mitocondriale e, con l'utilizzo del software MEGA 3.1 che utilizza il neighbor joining method (NJ) per effettuare analisi filogenetiche e di cluster, sono stati costruiti i rispettivi alberi

filogenetici, qui di seguito riportati. Per quanto riguarda la “soglia” di distanza genetica stabilita per affermare la presenza o meno di clonalità fra i DNA genomici messi a confronto, è stata stabilita da esperimenti preliminari effettuati con controlli positivi (per i quali la clonalità era stata stabilita mediante sequenziamento della regione V delle Ig) e negativi (per i quali sono state utilizzate popolazioni cellulari linfoidi provenienti da individui diversi).

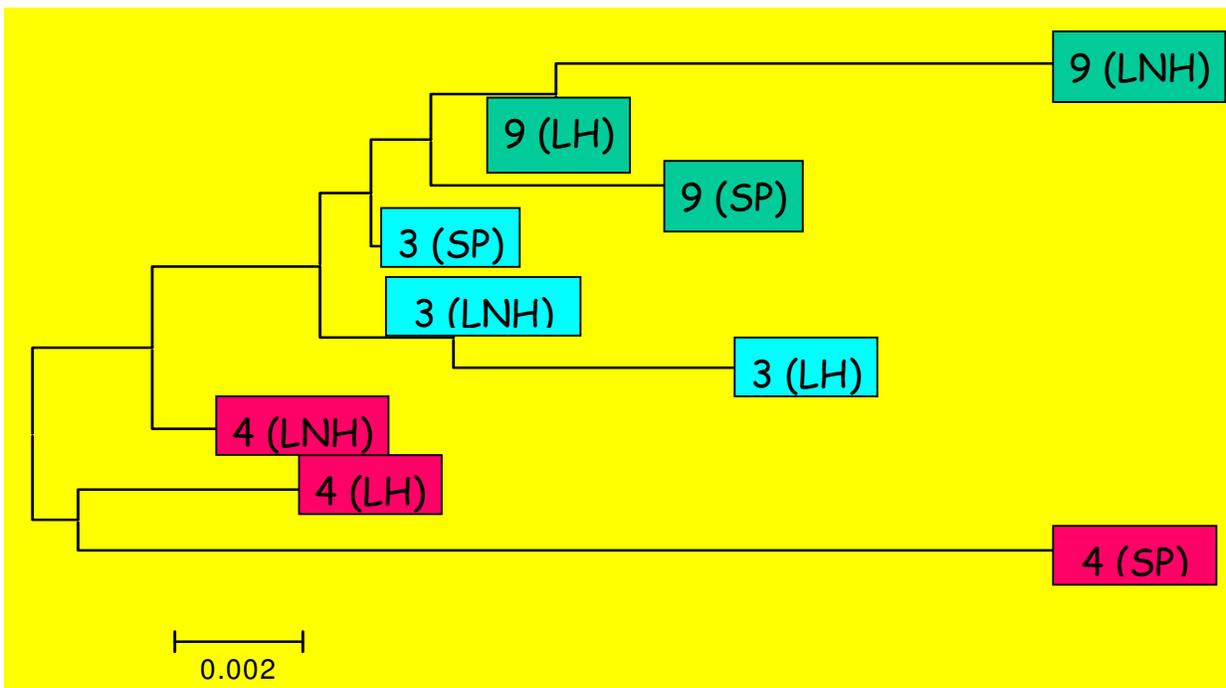
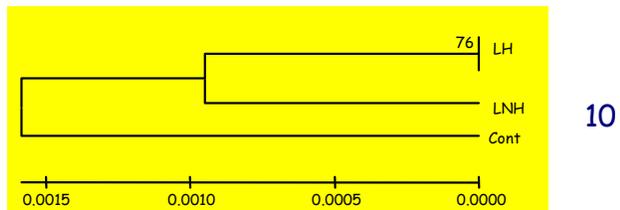
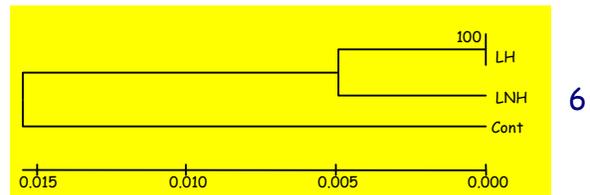
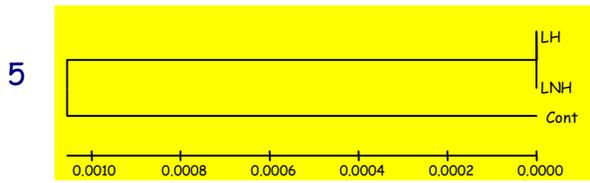
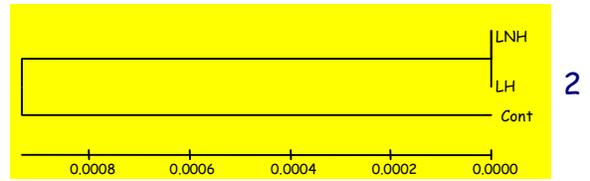
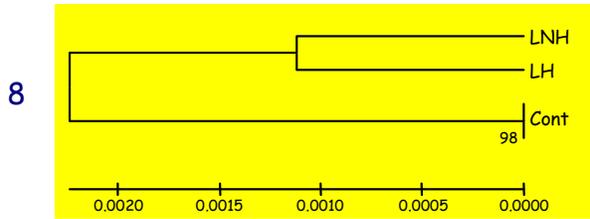
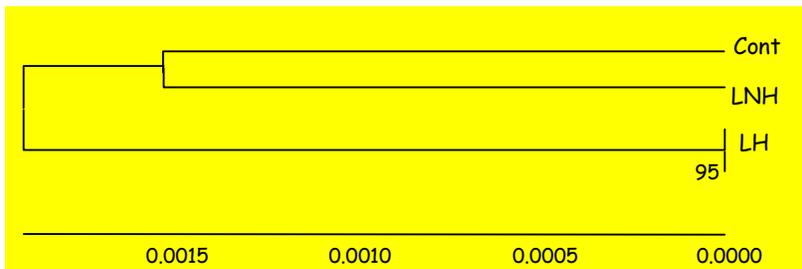


Figura 10

Albero filogenetico relativo ai tre pazienti tutt’ora viventi (rappresentati nella tabella delle caratteristiche cliniche con i numeri 9, 3 e 4); con SP si indica il DNA estratto a partire dal sangue periferico dei 3 pazienti e con LH e LNH il DNA estratto a partire rispettivamente dalle cellule di Reed-Sternberg del Linfoma di Hodgkin e dalle cellule tumorali del Linfoma non-Hodgkin.



7



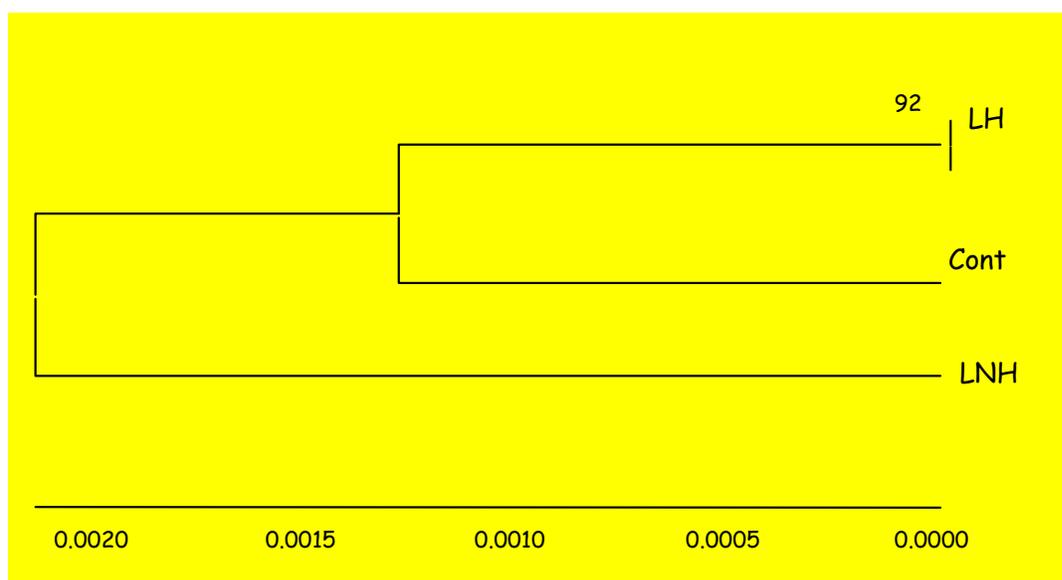


Figura 11

Alberi filogenetici relativi a sette pazienti deceduti in seguito alla seconda neoplasia (rappresentati nella tabella delle caratteristiche cliniche con i numeri 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10); con Cont si indica il DNA estratto a partire da cellule non tumorali prelevate dalla biopsia effettuata alla diagnosi di LH, con LH e LNH il DNA estratto a partire rispettivamente dalle cellule di Reed-Sternberg del Linfoma di Hodgkin e dalle cellule tumorali del Linfoma non-Hodgkin.

Analizzando gli alberi filogenetici 3, 9 e 4, relativi ai pazienti dai quali è stato possibile effettuare un prelievo di sangue periferico da utilizzare come controllo, si può affermare che nei primi due la distanza genetica fra le cellule tumorali del LH e quelle del LNH è tale da potere stabilire la presenza di clonalità fra i due tumori; nel terzo caso invece aumenta la distanza genetica fra LH e LNH e non è più ipotizzabile la presenza di un'origine clonale fra i due tumori.

Per quanto riguarda invece i restanti 7 alberi filogenetici, nei casi 2-5-6-8-10 la distanza genetica fra cellule di Reed-Sternberg e cellule tumorali del LNH è tale da potere affermare la derivazione da un progenitore clonale comune fra le cellule di

Reed-Sternberg del LH e le cellule tumorali del LNH, mentre gli alberi filogenetici dei casi 1 e 7 mostrano una distanza genetica superiore ai livelli prestabiliti per affermare la presenza di clonalità fra il tumore primario e il tumore secondario. Dalle analisi di clonalità effettuate si può quindi concludere che dei 10 pazienti che sono stati analizzati 7 mostrano una distanza genetica fra le cellule tumorali del LH e del LNH compatibile con un'origine da un progenitore comune, mentre i restanti 3 non presentano comunanze genetiche tali fra le due cellule tumorali tali da potere affermare la presenza di clonalità fra il LH e il LNH.

## DISCUSSIONE

L'instabilità genomica svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi e nella progressione tumorale. Essa procede in genere dall'accumulo di minime alterazioni strutturali, che coinvolgono poche paia di basi, ad alterazioni strutturali e funzionali di proto-oncogeni e/o oncosoppressori, favorenti l'accumulo di ulteriori alterazioni genetiche che possono svolgere un ruolo sia nel processo di trasformazione che nell'evoluzione delle cellule trasformate. Un punto cruciale nella genetica dei tumori che rimane da chiarire è se l'instabilità genomica sia un evento precoce, rilevante nella patogenesi della malattia, o un fenomeno secondario ad un evento trasformante esterno (infettivo, chimico o fisico) e come tale abbia un ruolo prevalente nella progressione della malattia (48).

Il Linfoma di Hodgkin (LH) è una delle neoplasie del sistema linforeticolare in cui si sono ottenuti i più importanti successi terapeutici già dagli anni 60-70, grazie all'introduzione nella pratica clinica di protocolli adeguati di chemio- e radioterapia, tanto da essere giudicata da Easson una neoplasia guaribile già dal 1963 (49). Tuttavia, nonostante l'atteggiamento di "prudenza terapeutica" suggerito dall'"European Organization for Reserach and Treatment of Cancer" (EORTC), inteso a proporzionare l'aggressività del trattamento a quella della malattia, i pazienti che guariscono dal LH mostrano a più di 20 anni dal trattamento un indice di mortalità di 3-4 volte superiore a quello di una popolazione di controllo, dovuta principalmente all'insorgenza di patologie d'organo indotte dal trattamento radiante e chimico e a neoplasie secondarie al LH (50-51). Evidenze molecolari, cellulari ed epidemiologiche suggeriscono la presenza di due meccanismi principali di cancerogenesi secondaria determinata dalla terapia per il primo tumore, vale a dire il targeting diretto di oncogeni potenzialmente trasformanti, con un tempo di latenza relativamente breve fra il primo e il secondo tumore, oppure il targeting indiretto, con

l'acquisizione di instabilità genomica, e quindi di una predisposizione allo sviluppo di neoplasie, con un tempo di latenza superiore fra il primo ed il secondo tumore (52). Diverse evidenze scientifiche si sono accumulate nel corso degli anni riguardo alla familiarità nello sviluppo del LH e all'instabilità genomica che caratterizza le cellule di Reed-Sternberg, che si manifesta fenotipicamente principalmente con un eterogeneo spettro di alterazioni genomiche, fra le quali mutazioni puntiformi di oncogeni e oncosoppressori e aberrazioni cromosomiche numeriche e strutturali (29, 32, 36). Recenti studi hanno evidenziato però anche la presenza di alterazioni cromosomiche nelle cellule linfoidi del sangue periferico dei pazienti che sviluppano LH sia prima che dopo la terapia e che il rilevamento di un significativo accorciamento dei telomeri alla diagnosi di LH, indice della presenza di instabilità genomica, possa essere correlato ad un aumento di sensibilità agli insulti genotossici arrecati dalla terapia per il LH e quindi anche ad un aumento di probabilità di sviluppo di seconde neoplasie (53, 54).

L'obiettivo principale di questo lavoro è stato quello di chiarire se vi sia una suscettibilità genetica alla manifestazione dell'instabilità genomica che, oltre a caratterizzare il LH, favorisca anche lo sviluppo anche dei tumori secondari al LH e quindi se si possa determinare la presenza di un background genetico comune negli individui che si ammalano di LH e, di seguito alla guarigione, sviluppano tumori secondari al LH.

Il numero relativamente esiguo di pazienti con LH che sviluppano un secondo tumore e il lungo tempo di latenza tra l'insorgenza del LH e delle neoplasie secondarie (fino a oltre 15 anni) ci hanno indotto ad optare per uno studio retrospettivo, che è stato effettuato sulle biopsie di tessuto linfomatoso recuperate da una casistica di 1256 pazienti, giunti alla diagnosi di LH dal 1972 al 2003 e caratterizzati per il quadro clinico all'esordio, per i tipi di trattamento eseguito e per il follow-up a lungo termine presso presso l'Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L. e A. Seragnoli" e per le modalità di trattamento radioterapico presso l'Istituto di Radioterapia "L. Galvani" dell'Università di Bologna.

L'attenzione è stata quindi focalizzata sui 121 pazienti di questa casistica che hanno sviluppato, in seguito alla guarigione dal LH, diversi tipi di neoplasie secondarie, principalmente Linfomi non-Hodgkin, carcinomi del polmone, carcinomi della mammella e Leucemie Acute Mieloidi (LAM). Di questi pazienti si è deciso di andare ad analizzare in dettaglio il profilo genomico di coloro che hanno sviluppato come neoplasie secondarie LAM e LNH: a tal fine è stata utilizzata la metodica dei "comparative genomic hybridization" (CGH) microarrays, che permette di individuare alterazioni strutturali, in particolare amplificazioni o delezioni, di geni potenzialmente rilevanti nel processo di cancerogenesi primaria e secondaria, utilizzando il DNA estratto da biopsie conservate in paraffina effettuate alla diagnosi dei tumori primari e secondari oppure da linfoghiandole reattive come controlli normali. Data la scarsissima presenza delle cellule tumorali di Reed-Sternberg nei linfonodi neoplastici del LH (meno del 2%), si è scelto di utilizzare per questo studio il DNA estratto da biopsie linfonodali "in toto", rappresentativo dei genomi dei pazienti in studio, dopo avere verificato mediante esperimenti preliminari di CGH-microarray che dal confronto di un DNA estratto dalla biopsia linfoghiandolare effettuata alla diagnosi di LH con il DNA dello stesso individuo proveniente da sangue periferico, non si rilevano differenze significative fra i due DNA genomici.

Dei sei pazienti che nella casistica hanno sviluppato una LAM secondaria al LH è stato possibile recuperare i blocchetti inclusi in paraffina effettuati alla diagnosi del primo tumore ed estrarre un DNA di buona qualità solamente di tre, che sono stati inseriti nelle analisi eseguite. Lo studio del genoma dei tre pazienti è stato condotto associando ad ognuno di questi un controllo, vale a dire un paziente di LH del tutto simile al Test per sottotipo istologico di malattia, stadio clinico alla diagnosi e follow-up terapeutico eseguito, ma che, a differenza di questo, non avesse sviluppato alcun secondo tumore.

Considerando i singoli esperimenti di CGH-microarray è emersa la presenza di variabilità genomica individuale nei tre pazienti; considerando però solamente le alterazioni che risultano comuni a tutti i tre pazienti, si sono rilevate 24

amplificazioni e 5 delezioni presenti nei genomi dei pazienti di LH che hanno sviluppato una LAM secondaria, messi a confronto con genomi di individui sani. Sono state invece rilevate 3 amplificazioni e 5 delezioni in geni e regioni che non risultano alterati nel confronto con individui sani, ma sono riscontrabili solamente dal confronto dei genomi dei pazienti che hanno sviluppato la LAM con i pazienti di LH che non hanno sviluppato neoplasie secondarie. Si è inoltre rilevato che la maggior parte delle alterazioni genomiche condivise da almeno due pazienti che hanno sviluppato la LAM secondaria sono state riscontrate anche nei pazienti di LH che non hanno sviluppato alcun secondo tumore messi a confronto con il pool di linfoghiandole reattive, a evidenziare che alterazioni genomiche sono presenti nei pazienti di LH rispetto ad individui sani indipendentemente dall'evoluzione di un secondo tumore.

La leucemogenesi secondaria al LH in vari studi riportati in letteratura è stata correlata alle dose di agenti alchilanti, nitrosuree ed epidofillotossine del protocollo MOPP e al numero di cicli di chemioterapia effettuati in corso di terapia per il LH e di fatti l'incidenza di LAM secondaria al LH è stata ridotta dall'uso di doxorubicina, bleomicina, vinblastina e decarbazina del protocollo ABVD e dalla riduzione del numero di cicli (35, 45). Dei pazienti inclusi nel nostro studio, tutti sono stati trattati per il primo tumore con la chemioterapia; di questi, due sono stati trattati col protocollo MOPP, e uno solo dei pazienti è stato trattato con protocolli combinati di chemioterapia e radioterapia.

Dai risultati presentati in questo studio risulta evidente che il danno genotossico che può essere inflitto dalla chemioterapia utilizzata per il LH si va a sommare a un substrato genomico in questi pazienti che hanno poi sviluppato una LAM secondaria al LH già di per sé evidentemente alterato. Le alterazioni genomiche rilevate che nella nostra casistica risultano comuni a tutti i tre pazienti e quindi possono essere associate allo sviluppo della LAM secondaria si restringono a pochi geni o regioni cromosomiche. Naturalmente il numero di pazienti inclusi in questo studio è troppo limitato per potere affermare che la rilevazione di queste alterazioni genomiche alla

diagnosi di LH possa essere considerato un fattore di rischio per lo sviluppo di una LAM secondaria; sarebbe però interessante poter confermare questi risultati su una casistica più ampia di pazienti e andare a investigare con adeguate metodiche di analisi molecolare quale possa essere il ruolo e la rilevanza di ogni singola alterazione individuata nel favorire l'insorgenza di un nuovo clone neoplastico.

L'altro risultato interessante che è emerso già da questa prima parte dello studio è la presenza di alterazioni genomiche specifiche e comuni a tutti i pazienti rilevabili alla diagnosi di LH, indipendentemente dall'evoluzione poi di una neoplasia secondaria, a dimostrazione di un quadro di instabilità genomica nei pazienti che sviluppano LH che non si limita alle cellule tumorali di Reed-Sternberg, come già riportato in letteratura, ma caratterizza il DNA genomico degli individui presi in considerazione.

Poiché è stato effettuato uno studio retrospettivo, non è stato possibile estrarre dalle biopsie osteo-midollari effettuate alla diagnosi delle LAM secondarie un DNA di buona qualità utilizzabile per esperimenti di CGH-microarray, per cui non si è potuto confrontare il DNA genomico dello stesso paziente proveniente dalle biopsie effettuate alla diagnosi del primo e del secondo tumore per verificare se vi siano state alterazioni molecolari aggiuntive, accumulate nel periodo di latenza fra il primo ed il secondo tumore, determinanti per la leucemogenesi secondaria; è però plausibile supporre che nel periodo di latenza fra la remissione dal primo tumore e l'insorgenza del secondo l'instabilità genomica di questi pazienti, sommata agli effetti della terapia, possano essere stati determinanti per l'insorgenza di un nuovo clone trasformato con le alterazioni molecolari caratterizzanti la LAM.

La seconda parte dello studio è stata poi incentrata sui pazienti della nostra casistica che hanno sviluppato come neoplasia secondaria al LH un LNH. A questi pazienti è stata dedicata particolare attenzione innanzitutto perché nella nostra casistica il LNH risulta essere il tumore secondario più frequente, con una percentuale che si attesta sul 17%, più del doppio di quanto riportato in letteratura, dove si parla di un'incidenza cumulativa dell'8%. Inoltre nella cancerogenesi secondaria al LH, i LNH hanno posto problematiche aggiuntive anche per la condivisione della

componente cellulare trasformata fra il tumore primario e secondario, vale a dire linfociti B del centro germinativo.

L'insorgenza di LNH secondari, come degli altri tumori solidi, è stata messa in correlazione all'utilizzo della radioterapia per il trattamento del primo tumore. Il meccanismo proposto per lo sviluppo di tumori solidi indotti dalla terapia, fra i quali si può includere anche il LNH, è quello dello sviluppo dilazionato nel tempo di diverse alterazioni genetiche, quindi di una instabilità genomica che determina nel tempo l'accumulo di lesioni genetiche potenzialmente trasformanti (52). Nella nostra casistica il tempo di latenza fra la guarigione dal primo tumore e l'insorgenza del LNH è inferiore a quanto riportato in letteratura (il tempo di latenza medio è di 8,8 anni vs 12 anni, e in alcuni casi non supera 1 anno), e ciò suggerisce già la presenza di una instabilità genomica intrinseca del paziente che possa avere velocizzato il processo di cancerogenesi secondaria o addirittura che l'evento trasformante determinante per lo sviluppo del LNH potesse essere già avvenuto alla remissione dal LH primario.

Negli ultimi anni in letteratura sono stati riportati alcuni casi di linfomi composti (LH e LNH): questi sono eventi rari, in cui i due linfomi possono essere sia concomitanti che sequenziali, sono comunemente di origine B e clonali. La presenza di alterazioni genetiche (rotture cromosomiche, traslocazioni, delezioni, riarrangiamenti e amplificazioni) nella maggioranza dei linfomi suggerisce che l'instabilità genomica rappresenti un meccanismo comune di linfomagenesi, proprio perché l'instabilità genomica richiesta per la diversificazione del repertorio anticorpale predispone le cellule linfoide all'acquisizione di alterazioni potenzialmente trasformanti; in uno studio di recente pubblicazione in cui sono stati analizzati molecolarmente alcuni di questi rari casi di linfomi composti è stato proposto un meccanismo che possa spiegare la diversa evoluzione di un progenitore comune a seguito di eventi trasformanti secondari a determinare l'insorgenza contemporanea o sequenziale di un linfoma di tipo Hodgkin e di uno di tipo non-Hodgkin (55-58).

Dei 21 pazienti che nella nostra casistica hanno sviluppato un LNH abbiamo potuto recuperare ed effettuare analisi molecolari sui DNA genomici estratti dai blocchetti inclusi in paraffina effettuati alla diagnosi dei tumori primario e secondario di 10 pazienti: in questo caso quindi gli esperimenti di CGH-microarray ci hanno permesso di confrontare il genoma dello stesso paziente da biopsie effettuate a distanza di pochi anni, vale a dire il tempo di latenza fra l'insorgenza del primo e del secondo tumore, periodo in cui si possono essere accumulati gli effetti degli insulti genotossici procurati dalla terapia per il LH. I risultati degli esperimenti di CGH-microarray ci hanno mostrato anche per questi pazienti dei profili genomici profondamente alterati già alla diagnosi del primo tumore evidenziati dal confronto con i DNA genomici estratti da controlli normali (la numerosità più elevata di questo gruppo di pazienti ci ha permesso di effettuare analisi statistiche in base alle quali sono stati elencati solamente i geni che risultavano alterati in comune ai pazienti considerati, ma anche in questo caso si è rilevata la presenza di variabilità fra i diversi profili genomici individuali). Inoltre non si sono rilevate differenze significative nel confronto dei genomi degli stessi pazienti estratti alla diagnosi del primo e del secondo tumore, a dimostrare l'effetto praticamente nullo della terapia durante il tempo di latenza fra la manifestazione clinica del primo e del secondo tumore sull'insorgenza di alterazioni strutturali nei geni e regioni analizzati con la metodica dei CGH-microarray.

Il passo successivo è stato poi quello di andare a verificare la presenza di clonalità fra le cellule tumorali di Reed-Sternberg e le cellule tumorali del LNH: i due scenari che si prospettavano erano quelli di una evoluzione di un progenitore comune trasformato la cui espressione clinica si fosse dilazionata nel tempo per l'insorgenza prima del LH e poi del LNH, oppure di due eventi trasformanti distinti e sequenziali, ma comunque su progenitori già di per sé geneticamente instabili (in quest'ultimo caso si poteva ipotizzare che difetti di riparazione di double-strand breaks (DSB) "non programmati" indotti dal trattamento chemio- e/o radioterapico avessero potuto giocare un ruolo non marginale). La terza ipotesi che si poteva supporre, che resta ancora in parte da chiarire attraverso una rivalutazione appropriata delle biopsie

all'esordio clinico di malattia, era che i due linfomi potessero essere presenti simultaneamente già alla diagnosi del primo tumore, ma che non fossero stati riconosciuti: questa ipotesi è da tenere in considerazione sia perchè in questo studio retrospettivo sono stati analizzati pazienti la cui diagnosi di LH risale ormai a diversi anni addietro, quando la caratterizzazione immunofenotipica del LH e dei LNH era più elusiva e non si avvaleva delle diverse metodiche di analisi molecolare utilizzate attualmente nella pratica diagnostica dei linfomi, sia per l'importanza per la pratica clinica dell'eventuale caratterizzazione di una patologia distinta caratterizzata dalla presenza contemporanea delle due entità cliniche, che si possa eventualmente giovare di un approccio terapeutico diverso da quello previsto per i LH classici.

Dall'analisi di clonalità effettuata è emerso un quadro abbastanza omogeneo fra i pazienti della nostra casistica di cui è stato possibile effettuare analisi molecolari, con sette pazienti che presentano una "distanza genetica" fra i DNA mitocondriali delle due cellule tumorali compatibile con un'origine dei due linfomi da un progenitore comune. L'ipotesi più plausibile dunque, già suggerita da alcuni studi con analisi di clonalità effettuate su LH e LNH compositi, è quella di un evento trasformante primario comune alle due cellule tumorali del LH e LNH, che poi debbano aver subito nel corso del tempo eventi trasformanti addizionali e distinti che abbiano determinato nel primo caso l'insorgenza del LH, con la manifestazione fenotipica delle cellule di Reed-Sternberg, mentre nel secondo caso, e nella nostra casistica anche a distanza di tempo, l'insorgenza del LNH (59). Da questo quadro risulta più chiaro, e comunque può essere in parte ridimensionato, il ruolo che può aver giocato la terapia effettuata per il LH nell'insorgenza del secondo tumore: gli insulti genotossici arrecati dalla chemio-radioterapia si possono essere sommati su un substrato cellulare in cui un evento trasformante primario era già stato determinato, e quindi possono essere stati determinanti più nel favorire che nel causare la manifestazione clinica del LNH secondario. Se nel caso delle LAM secondarie al LH la terapia andava ad agire su un substrato cellulare già caratterizzato da instabilità genomica, e quindi già di per sé predisposto all'acquisizione di ulteriori alterazioni

molecolari che possano aver favorito nel tempo l'insorgenza del tumore secondario, nel caso dei LNH secondari oltre al substrato cellulare già instabile geneticamente, abbiamo una cellula linfoide presumibilmente avviata verso la trasformazione neoplastica secondaria già al momento della diagnosi del primo tumore, in attesa di un evento scatenante che la porti alla manifestazione fenotipica del LNH.

Alla luce di queste osservazioni, il quesito più importante che si pone è con quale approccio terapeutico, e soprattutto con che carico di insulti genotossici, si debba affrontare il LH, neoplasia classificata come guaribile già da alcuni decenni, ma che a pari passo con i successi della terapia ha mostrato tutta una serie di problematiche da non sottovalutare proprio per la scelta della terapia e per la prognosi a lungo termine di una considerevole percentuale di pazienti affetti da questa malattia.

Un'ottima soluzione che si sta proponendo negli ultimi anni per diverse patologie neoplastiche, alla luce dei successi ottenuti dopo l'introduzione nella pratica clinica dell' Imatinib per la cura della Leucemia Mieloide Cronica, è quella dell'utilizzo di terapie biologiche mirate, in grado di "correggere" eventi rilevanti per la patogenesi della neoplasia a livello molecolare senza arrecare insulti genotossici nei genomi dei pazienti da trattare. Per quanto riguarda il LH, un piccolo ritardo nella definizione di target terapeutici significativi è dovuto sicuramente al fatto che solo negli ultimi anni si stanno definendo i pathways antiapoptitici e proliferativi coinvolti nella patogenesi di questo tumore, dopo che nel 1994 Küppers fu in grado di chiarire l'origine clonale delle cellule di Reed-Sternberg da cellule B pre-apoptitiche del centro germinativo e che nella classificazione WHO dei linfomi la "Malattia di Hodgkin" venne rinominata a "Linfoma di Hodgkin" (30, 43).

Negli ultimi anni si è quindi arrivati ad attivare dei trials clinici per l'utilizzo di anticorpi diretti contro markers extracellulari per attaccare direttamente la popolazione tumorale con meccanismi immunologici (MDX-060 e SGN-30 sono anticorpi anti-CD30, CAT-354 è un anticorpo anti-IL13, CHIR-12.12 è un anticorpo anti CD-40), di farmaci mirati che hanno come targets molecole a livello intracellulare (SPC-839 è un inibitore competitivo dell'ATP, Bortezomib è un

inibitore della subunità 26S del proteasoma, RelA è un oligonucleotide antisense diretto contro NF- $\kappa$ B, AEG35156 è un antisense diretto contro la proteina XIAP, ecc.) e anche di strategie immunologiche che utilizzano come target le proteine codificate dal virus di Epstein-Barr (EBV), dato il suo potenziale trasformante nel LH (43). Per quanto riguarda il virus EBV come target terapeutico, un beneficio ulteriore di questo tipo di terapia potrebbe riguardare proprio l'instabilità genomica secondaria a infezione virale delle cellule linfoidi degli individui che sviluppano un LH, che secondo alcuni recenti studi sembra essere favorita in parte dalle proteine virali codificate dal virus: in particolare la proteina LMP1 è in grado di determinare l'overespressione di proteine intracellulari, fra le quali è stata individuata la Bmi-1, che attivano pathways intracellulari determinanti per l'insorgenza del LH e di reprimere l'attività trascrizionale di p-53, e quindi anche tutti i pathways di riparazione del DNA attivati dalla p-53 stessa, favorendo l'insorgenza e il mantenimento di aberrazioni cromosomiche plausibilmente determinanti per i processi di tumorigenesi primario e secondario (60, 61).

Alla luce delle informazioni fornite da questo studio, sembra ormai chiaro che i pazienti che sviluppano LH presentano un quadro di instabilità genomica abbastanza complesso e rilevante innanzitutto per lo sviluppo del LH stesso e in un secondo momento per lo sviluppo dei tumori secondari al LH in una considerevole percentuale di pazienti che guariscono dal primo tumore. Il risultato sicuramente più interessante e innovativo fornito dagli esperimenti di CGH-microarray, ulteriormente confermato da studi paralleli a questo effettuati da altri gruppi, è quello della presenza di una instabilità genomica intrinseca nei pazienti che sviluppano LH, rilevata da analisi molecolari effettuate direttamente sul DNA estratto dai linfonodi "in toto" di questi individui e sovrapponibile al DNA estratto dal sangue periferico (54). E' plausibile supporre che un contributo a questa instabilità genomica, determinato da infezione virale di EBV sulle cellule linfoidi, e possibilmente associato ad altri fattori esterni (ambientali, alimentari, ecc.) possa determinare inizialmente l'insorgenza del LH. Ciò che emerge da queste analisi molecolari è

inoltre un “arricchimento” nel corso del tempo di questo quadro di instabilità genomica su alcuni substrati cellulari, dovuto plausibilmente alla terapia effettuata per il LH in associazione con eventuali ulteriori fattori esterni non identificabili con il tipo di analisi effettuate in questo contesto (che si localizza quindi più localmente a livello delle sedi irradiate per coloro che hanno effettuato la radioterapia, a determinare l’insorgenza di tumori solidi secondari, oppure a livello sistemico per coloro che hanno effettuato la chemioterapia, a determinare l’insorgenza di leucemie secondarie).

Questo tipo di analisi molecolari ci ha inoltre permesso di identificare un numero limitato di geni e regioni le cui alterazioni strutturali sono associate allo sviluppo di specifici tumori secondari al LH. Ciò che sarebbe interessante e si propone di approfondire in studi futuri con metodiche mirate di biologia molecolare ed eventualmente anche con studi in vivo sul topo è il ruolo specifico di ogni singola alterazione nella patogenesi tumorale del LH e degli specifici tumori secondari al LH. Inoltre resta da chiarire se fra i geni individuati in questo studio ve ne sia uno o un numero limitato che possano essere caratterizzati come “master genes”, la cui alterazione molecolare cioè possa essere considerata alla base dell’instabilità genomica di questi individui e sia quindi in grado di determinare la predisposizione allo sviluppo di tumori. Inoltre, poichè il limite della metodica dei CGH-microarray è quello di riuscire ad individuare solamente la presenza di amplificazioni e delezioni nei geni e regioni analizzati, sarebbe interessante andare a ricercare anche l’eventuale presenza di altri tipi di alterazioni (mutazioni puntiformi sul DNA, traslocazioni, inversioni, alterazioni a livello di splicing dell’RNA) andando ad analizzare in modo specifico ed approfondito un numero limitato geni di interesse.

In particolare, considerando l’importante ruolo dei geni deputati al riparo del DNA e all’avvio di pathways proapoptotici nel mantenimento dell’integrità genomica sarebbe auspicabile andare a verificare in dettaglio la presenza di mutazioni in queste categorie di geni. Infatti, è ormai noto che se singolarmente difetti si proteine coinvolte nella riparazione del DNA tramite il meccanismo di NHEJ determinano il

fenotipo comune associato alla perdita di geni “caretaker” caratterizzato da immunodeficienza, senescenza prematura, ipersensibilità al danno radio-indotto, instabilità genomica e predisposizione allo sviluppo di linfomi, il rischio di trasformazione neoplastica è ulteriormente incrementato dalla perdita concomitante di geni “gatekeeper”, il cui ruolo è prevenire la propagazione delle sequenze geniche non o mal riparate e, la contemporanea presenza di questi difetti incrementa ulteriormente il rischio soprattutto in popolazioni come i linfociti B, per i quali l’instabilità genomica è richiesta fisiologicamente per la diversificazione del repertorio anticorpale (mutazioni associate di p53 e Artemis sono infatti coinvolte nella patogenesi e nella progressione dei linfomi B) (62, 63).

In conclusione, se è ormai nota da alcuni anni la presenza di familiarità nello sviluppo innanzitutto del LH e in un secondo momento delle neoplasie secondarie al LH, con questo lavoro si è cercato di contribuire a gettare le basi per definire in particolare le alterazioni genetiche che caratterizzano i pazienti che sviluppano questo tipo di neoplasia. In quanto retrospettivo, questo studio ci ha consentito di effettuare analisi molecolari su un numero ristretto di casi, sebbene la casistica da cui abbiamo potuto attingere fosse sicuramente ragguardevole, a causa delle modalità di conservazione dei campioni biotipici durante gli scorsi decenni sicuramente non ideali per l’effettuazione di analisi molecolari. Per questo, sarà interessante andare a verificare la presenza delle alterazioni da noi rilevate nei campioni che è stato possibile testare, in nuovi campioni prelevati da biopsie effettuate alla diagnosi di LH, mediante esperimenti effettuati direttamente su campione fresco e mediante l’allestimento e la raccolta in una nuova banca di tutti i nuovi casi di LH che permetta la conservazione di tutti i campioni mediante congelamento.

## **Bibliografia**

1. D.B. Lombard, K.F. Chua, R. Mostoslavsky, S. Franco, M. Gostissa, F.W. Alt. DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*. 2005; 120: 497-512.
2. M. Seifert, J. Reichrath. The role of the human mismatch repair gene hMSH2 in DNA repair, cell cycle control and apoptosis: implications for pathogenesis, progression and therapy of cancer. *J. Mol. Histol.* 2006; 37: 301-307.
3. D. Leibel, P. Laspe, S. Emmert. Nucleotide excision repair and cancer. *J. Mol. Histol.* 2006; 37: 225-238.
4. L. H. Thompson, D. Schild. Homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability. *Mut. Res.* 2001; 477: 131-153.
5. P.A. Jeggo, M. Lobrich. Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell Cycle* 2005; 4(3): 359-362.
6. D.O. Ferguson, J.M. Sekiguchi, S. Chang, K.M. Frank, Y. Gao, et al. The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *PNAS* 2000; 97(12): 6630-6633.
7. A.K. Abbas, A.H. Lichtman, J.S. Pober. *Immunologia cellulare e molecolare*. Ed. Masson 2006, 5° Ediz.
8. D. Jung, C. Giallourakis, R. Mostoslavsky, F.W. Alt. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 2006; 24: 541-570.
9. M. Inlay, Y. Xu. Epigenetic regulation of antigen receptor rearrangement. *Clin. Immunol.* 2003; 109: 29-36.
10. K. Johnson, C. Angelin-Duclos, S. Park, K.L. Kalame. Changes in histone acetylation are associated with differences in accessibility of V<sub>H</sub> gene segments to V-DJ recombination during B-cell ontogeny and development. *Mol. Cell. Biol.* 2003; 23: 2438-2450.
11. E. Market, F.N. Papavasiliou. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *Plos. Biol.* 2003; 1: 24-27.

- 12.R.M. Cobb, K.J. Oestreich, O.A. Osipovich, E.M. Oltz. Accessibility control of V(D)J recombination. *Adv. Immunol.* 2006; 91: 45-109.
- 13.K. Johnson, M. Shapiro-Shelef, C. Tunyaplin, K. Calame. Regulatory events in early and late B-cell differentiation. *Mol. Immunol.* 2005; 42: 749-761.
- 14.S. R., J.Chaudhuri, F.W. Alt. The role of the non-homologous end-joining pathway in lymphocyte development. *Immunol. Rev.* 2004; 200: 115-131.
- 15.G. Vanasse, P. Concannon, D.M. Willerford. Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood* 1999; 15: 3997- 4010.
- 16.S. Tura, M. Baccarani. *Corso di Malattie del Sangue e degli organi emopoietici* Ed.Esculapio 2003.
- 17.L. Yung, D. Linch. Hodgkin's lymphoma. *The lancet* 2003; 361: 943-951.
- 18.V. Diehl, R.K. Thomas, D. Re. Part II: Hodgkin's lymphoma- diagnosis and treatment. *The lancet.* 2004; 5:19-26.
- 19.L. Specht, R.G. Gray, M.J. Clarke, R. Peto. Influence of more extensive radiotherapy and adjuvant chemotherapy on long term outcome of early stage Hodgkin's disease: a metanalysis of 23 randomized trials involving 3888 patients. *Journal of Clinical Oncology* 1988; 16: 830-838.
- 20.S.J. Horning, R.T. Hoppe, J. Mason, B.W. Brown, et al. Stanford-Kaiser Permanente G1 study for clinical stage I to II Hodgkin's disease: subtotal lymphoid irradiation versus vinblastine, methotrexate and bleomycin chemotherapy and regional irradiation. *J. Clin. Oncol.* 1997;15: 1736-1744.
- 21.R. Schnell, E. Vitetta, J. Schindler, P. Borchmann, et al. Treatment of refractory Hodgkin's Lymphoma patients with an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin. *Leukemia* 2000; 14: 129-135.
- 22.F. Hartmann, C. Renner, W. Jung, M. Pfreundschuh. AntiCD16/CD30 bispecific antibodies as possible treatment for refractory Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 1998; 31: 385-382.
- 23.R.T. Hoppe. Hodgkin's disease: complications of the therapy and excess mortality. *Ann. Oncol.* 1997; 1: 115-121.

- 24.E. Cellai, S.M. Magrini, G. Masala, R. Alterini, G. Biti, et al. The risk of second malignant tumors and its consequences for the overall survival of Hodgkin's disease patients and for the choice of their treatment at presentation: analysis of a series of 1524 cases consecutively treated at the Florence University Hospital. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001; 49:1327-1337.
- 25.S. Bhatia, L.L. Robinson, O. Oberlin, M. Greenberg, et al. Breast cancer and other neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 745-751.
- 26.H. Tanooka. Threshold dose response in radiation carcinogenesis: An approach from chronic  $\beta$ -irradiation experiments and a review of non-tumor doses. *Int. J. Radiat. Biol.* 2001; 77: 541-551.
- 27.N.G. AK, P. Bernardo, E. Weller, K.H. Backstrand, B. Silver, et al. Long-term survival and competing causes of death in patients with early-stage Hodgkin's disease treated at age 50 or younger. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 2101-2108.
- 28.E.M, Maggio, E. Stekelenburg, A. Van den Berg, S. Poppema. TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus. *Int. J. Cancer* 2001; 94: 60-66.
- 29.R.K. Thomas, D. Re, J. Wolf, V. Diehl. Hodgkin's lymphoma- molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol.* 2004; 5(1): 11-8.
- 30.R. Kuppers, I. Schwering, A. Brauninger, K. Rajewsky, M.L. Hansmann. Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* 2002; 13: 11-18.
- 31.R. Kuppers, M.L. Hansmann. The Hodgkin and Reed-Sternberg cell. *Int. J. Bioch. Cell Biol.* 2005; 37: 511-517.
- 32.Y.Y. Shugart, K. Hemminki, P. Vaittinen, A. Kingman. Apparent anticipation and heterogeneous transmission patterns in familial Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphoma: report from a study based on Swedish cancer database. *Leuk. Lymphoma* 2001 42(3), 407-415.
- 33.M.K. Gandhi, J.T. Tellam, R. Khanna. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2004; 125: 267-281.

- 34.L.C. Harty, A.Y. Lin, A.M. Goldstein, E.S Jaffe, et al. HLA-DR, HLA-DQ and TAP genes in familial Hodgkin's disease. *Blood* 2002; 99(2): 690-693.
- 35.S.L. Hancock. Secondary neoplasms after Hodgkin's disease in Hodgkin's lymphoma. Choice of therapy and late complications. In: Perry M.C. (ed): *Hematology*, Alexandria, VA: ASH 2000; 212-222.
- 36.A. Staratschek-Jox, Y.Y. Shugart, S.S. Strom, A. Nagler. G.M. Taylor. Genetic susceptibility to Hodgkin's lymphoma and to secondary cancer: workshop report. *Ann. Oncol.* 2002; 13: 30-33.
- 37.Y.Y. Shugart, K. Hemminki, P. Vaittinen, A. Kingman. Apparent anticipation and heterogeneous transmission patterns in familial Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma: report from a study based on Swedish cancer database. *Leuk. Lymphoma* 2001; 42(3): 407-415.
- 38.D. Re, T. Zander, V. Diehl, J. Wolf. Genetic instability in Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol.* 2002; 13: 19-22.
- 39.D. Falzetti, B. Crescenzi, C. Matteucci, B. Falini, M.F. Martelli, H. van den Berghe, C. Mecucci. Genomic instability and recurrent breakpoints are main cytogenetic findings in Hodgkin's disease. *Haematologica* 1999; 84: 298-305.
- 40.T. Stankovic, A.M. Kidd, A. Sutcliffe, G.M. McGuire, et al. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62(2): 334-345.
- 41.E. Liberzon, S. Avigad, I. Yaniv, B. Stark, et al. Molecular variants of the ATM gene in Hodgkin's disease in children. *Br. J. Cancer.* 2004; 90: 522-525.
- 42.M. Takagi, R. Tsuchida, K. Oguchi, T. Shigeta, et al. Identification and characterization of polymorphic variations of the ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene in childhood Hodgkin disease. *Blood* 2004; 103(1): 283-290.
- 43.D. Re, R.K. Thomas, K. Behringer, V. Diehl. From Hodgkin disease to Hodgkin lymphoma: biologic insights and therapeutic potential. *Blood* 2005; 105(12): 4553-4560.

44. J.M. Connors. Hodgkin's lymphoma: the hazards of success. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 3388-3390.
45. J. Pedersen-Bjergaard. Insights into leukemogenesis from therapy-related leukaemia. *N. Eng. J. Med.* 2005; 352: 1591-1594.
46. Saitou N, Nei M. The neighbor Joining method: a new method to reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Bio. Evol.* 1987; 4: 406-425.
47. T. Papadaki, S. Stamatopoulos. Hodgkin disease immunopathogenesis: long-standing questions, recent answers, further directions. *Trends Immunol.* 2003; 24(9): 508-511
48. C. Lengauer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998; 396: 643-648.
49. E.C. Eason, M.H. Russell. The cure of Hodgkin's disease. *BMJ.* 1963; 1: 1704-1707.
50. M. Tubiana, M. Henry-Amar, M. Hayat. The EORTC treatment of early stages of Hodgkin's disease. *J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1984; 10: 197-210.
51. N.G. Ak, P. Bernardo, E. Weller, K.H. Backstrand, B. Silver, K.C. Marcus, N.J. Tarbell, J. Friedberg, G.P. Canellos, P.M. Mauch. Long term survival and competing causes of death in patients with early-stage Hodgkin's disease treated at age 50 or younger. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 2101-2108.
52. J.M. Allan and L.B. Travis. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nature Reviews.* 2005; 5: 943-955.
53. R. M'Kacher, T. Girinsky, S. Koscielny, J. Dossou, D. Violot, N. Beron-Gaillard, et al. Baseline and treatment-induced chromosomal abnormalities in peripheral blood lymphocytes of Hodgkin's Lymphoma patients. *Int. J. Radiat. Biol. Phys.* 2003; 57(2): 321-326.
54. R. M'Kacher, A. Bennaceur-Griscelli, T. Girinsky, S. Koscielny, F. Delhommeau, J. Dossou, D. Violot, E. Leclercq, et al. Telomere shortening and associated chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes of patients

- with Hodgkin's Lymphoma prior to any treatment are predictive of second cancers. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2007; 68(2): 465-471.
55. R. Rosenquist, F. Menestrina, M. Lestani, R. Kuppers, M.L. Hansmann, A. Brauninger. Indications for peripheral light-chain revision and somatic hypermutation without a functional B-cell receptor in precursors of a composite diffuse large B-cell and Hodgkin lymphoma. *Lab. Invest.* 2004; 84: 253.
56. R. Kuppers, A.B. Souisa, A.S. Baur, J.G. Strickler, K. Rajewsky, M.L. Hansmann. Common germinal center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. *Mol. Med.* 2001; 7: 285.
57. R. Schmitz, C. Rennè, R. Rosenquist, M. Tinguly, V. Distler, F. Menestrina, M. Lestani, T. Stankovic, B. Austen, A. Brauninger, M.L. Hansmann, R. Kuppers. Insights into the multistep transformation process of lymphomas: IgH-associated translocations and tumor suppressor gene mutations in clonally related composite Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia.* 2005; 19: 1452-1457.
58. R. Rosenquist, F. Menestrina, M. Lestani, R. Kuppers, M.L. Hansmann, A. Brauninger. Indications for peripheral light-chain revision and somatic hypermutation without a functional B-cell receptor in precursors of a composite diffuse large B-cell and Hodgkin's lymphoma. *Lab. Invest.* 2004; 84: 253-262.
59. A. Brauninger, M.L. Hansmann, J.G. Strickler, R. Dummer, G. Burg, K. Rajewsky, R. Kuppers. Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *NEJM.* 2005; 340(16): 1239-1245.
60. M.T. Liu, Y.T. Chang, S.C. Chen, Y.C. Chuang, Y.R. Chen, C.S. Lyn, J.Y. Chen. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses p53-mediated DNA repair and transcriptional activity. *Oncogene.* 2005; 24: 2635-2646.
61. A. Dutton, C.B. Woodman, M.B. Chukwuma, J.I. Last, W. Wei, M. Vockerodt, et al. Bmi-1 is induced by the Epstein-Barr virus oncogene LMP1 and regulates the

- expression of viral target genes in Hodgkin lymphoma cells. *Blood*. 2007; 109(6): 2597-2603.
62. S. Rooney, J.A. Sekiguchi, S. Whitlow, M. Eckersdorff, J.P. Manis, C. Lee, D.O. Ferguson, F.W. Alt. Artemis and p53 cooperate to suppress oncogenic N-Myc amplification in progenitor B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101: 2410-2415.
63. D. Moshous, C. Pannetier, R. de Chasseval, F. le Deist, M. Cavazzana-Calvo, S. Romana, et al. Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *J.Clin.Inv.* 2003 ; 11(3) : 381-387.