

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SALUTE DELLA DONNA E DEL BAMBINO

Direttore: Prof. Giorgio Perilongo

UOC ONCOEMATOLOGIA PEDIATRICA

Direttore: Prof.ssa Alessandra Biffi

TESI DI LAUREA

**Ricostituzione immunologica in pazienti pediatrici
trattati per Linfoma non Hodgkin B secondo il
protocollo AIEOP LNH-97 nell'era del Rituximab**

Relatore: Prof.ssa Alessandra Biffi

Correlatore: Dott.ssa Marta Pillon

Laureanda: Sofia Giudici

Anno accademico 2021/2022

INDICE

1.ABSTRACT	1
1.1. Riassunto	1
1.2. Abstract in inglese	3
2.INTRODUZIONE	5
2.1. Linfoma non Hodgkin pediatrico	5
2.2. Epidemiologia	5
2.3. LnH B pediatrici	6
2.3.1.Patogenesi	6
2.3.2.Associazione tra i disordini linfoproliferativi e condizioni di immunodeficit primitivo	10
2.4. Presentazione clinica	10
2.5. Diagnosi	11
2.5.1.Stadiazione di Murphy	12
2.5.2.Stadiazione IPNHLSS (International Pediatric Non- Hodgkin Lymphoma Staging System)	14
2.6. Trattamento del LnH pediatrico: protocollo AIEOP LNH-9	16
2.6.1.Stratificazione del rischio e schema terapeutico	16
2.7. Prognosi	19
2.8. Rituximab	20
2.8.1.Ipogammaglobulinemia post-rituximab nell'adulto	23
2.8.2.Ipogammaglobulinemia post-rituximab nel paziente pediatrico	24
3.SCOPO ED OBIETTIVI DELLO STUDIO	25
4.PAZIENTI, MATERIALI E METODI	27
4.1.Selezione dei pazienti e criteri di inclusione	27
4.2.Dosaggio di IgG	28

4.3. Analisi statistica	29
5. RISULTATI	31
5.1. Caratteristiche Della Popolazione	31
5.2. Protocollo terapeutico.....	33
5.3. Caratteristiche dei pazienti nei due gruppi di studio	34
5.4. Follow up valori di immunoglobuline nel gruppo AIEOP LNH-97 + Rituximab ed eventi infettivi	38
5.5. Caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione durante/al termine della terapia.....	41
5.6. Caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione a un anno.....	44
5.7. Caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione a due anni.....	47
5.8. Analisi RFS.....	49
6. DISCUSSIONE	53
7. CONCLUSIONE	59
8. BIBLIOGRAFIA	61

1. ABSTRACT

1.1. Riassunto

Introduzione: I Linfomi non Hodgkin (LnH) sono, in Italia, la terza neoplasia maligna più frequente nel paziente pediatrico con un'incidenza che aumenta linearmente con l'aumentare dell'età. Nel corso degli ultimi anni l'innovazione delle tecniche diagnostiche ha permesso una miglior definizione biologica dei differenti tipi di linfoma; questo ha condotto allo sviluppo di protocolli terapeutici innovativi con conseguente miglioramento della prognosi.

In Italia il protocollo terapeutico principalmente utilizzato è AIEOP LNH-97. Negli ultimi anni, il successo osservato in studi clinici condotti sull'adulto circa l'utilizzo di Rituximab, un farmaco che agisce inducendo la deplezione di cellule B esprimenti CD20, nel trattamento di neoplasie ematologiche ha determinato l'avvio di studi volti a determinarne l'efficacia anche nel paziente pediatrico: i risultati hanno condotto all'aggiunta della molecola anche nei protocolli standard di trattamento dei LnH del bambino.

Obiettivi dello studio: A seguito dell'immissione in commercio della molecola, e quindi del suo utilizzo nell'adulto, in letteratura sono stati pubblicati numerosi dati circa gli effetti collaterali del farmaco, con particolare attenzione all'ipogammaglobulinemia come suo effetto secondario. Questa causa un aumentato rischio di contrarre infezioni e spesso viene trattata con somministrazione di immunoglobuline (Ig) per via endovenosa. Pochi dati sono stati invece raccolti sugli effetti di Rituximab nel paziente pediatrico. È stato condotto uno studio retrospettivo comparativo con l'obiettivo di descrivere le caratteristiche dei pazienti pediatrici che, nel corso degli ultimi venti anni, hanno avuto diagnosi di LnH-B di alto grado e sono stati sottoposti a trattamento basato sul protocollo AIEOP LNH-97 in associazione o meno con Rituximab. Sono stati raccolti ed analizzati i dati clinici e biumorali per poter verificare il sussistere della condizione di ipogammaglobulinemia eventualmente associata ad aumento del numero di eventi infettivi maggiori e sono stati valutati i casi nei quali si è resa necessaria la supplementazione di immunoglobuline per via endovenosa.

Materiali e metodi: Sono stati analizzati i dati relativi a 118 pazienti con diagnosi di LnH nel periodo di tempo compreso tra Gennaio 1999 e Dicembre 2021 trattati presso la clinica di Oncoematologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova secondo il protocollo AIEOP LNH-97 con associazione o meno di Rituximab. L'ipogammaglobulinemia è definita da valori di IgG < 5,00 g/l.

Risultati: La popolazione dello studio comprendeva 92/118 (78%) pazienti di sesso maschile e 26/118 (22%) pazienti di sesso femminile con età media alla diagnosi 9,9 anni e età mediana alla diagnosi 10,2 anni (range 2,1-17,8 anni). La maggior parte dei pazienti alla diagnosi è stata assegnata al gruppo di rischio R4 (46,6%) e allo stadio III (53,4%).

55 pazienti hanno ricevuto Rituximab: livelli di IgG < 5,00 g/l sono stati rilevati in 27 (49%) pazienti al termine della terapia. In 30 (55%) pazienti si è resa necessaria la supplementazione di Ig endovena durante/al termine della terapia, in 25 (45,5%) a distanza di un anno e in 10 (18,2%) anche a distanza di due anni. Dei 27 pazienti con livelli di IgG < 5,00 g/l 14 hanno avuto un evento infettivo, mentre 13 casi non hanno avuto alcuna manifestazione; dei 28 pazienti con livelli di IgG > 5,00 g/l 8 hanno avuto un evento infettivo, mentre 20 nessuna manifestazione. L'analisi statistica condotta ha dimostrato dunque una mancata correlazione tra il valore di IgG e il verificarsi di eventi infettivi maggiori (*p-value* 0.07).

È stata inoltre valutata la probabilità di sopravvivenza libera da recidiva (RFS) nei 118 pazienti, che è risultata pari al 96% (ES±1%). Non si sono inoltre rilevate differenze statisticamente significative stratificando i pazienti secondo il gruppo di rischio (*p-value*=0.18) e la presenza di eventi infettivi (*p-value*=0.22).

Conclusioni: Lo studio ha permesso di definire come l'ipogammaglobulinemia sia un effetto secondario alla terapia con Rituximab spesso rilevato durante/al termine del protocollo terapeutico che può essere associato con aumentato rischio infettivo. È importante dunque monitorare sin dal momento della diagnosi il valore di Ig e continuare il dosaggio per tutta la durata della terapia e anche successivamente, così da poter rilevare eventuali deficit ed iniziare una terapia di supplementazione.

1.2. Abstract in inglese

Background: Non Hodgkin Lymphoma (NHL) is a heterogeneous group of lymphoid malignancies that represent the third most common malignancy in children and adolescent consisting of a few histological subtypes: Mature B-Cell Non Hodgkin Lymphoma account for about 60% of NHL; the main subtypes are: Burkitt Lymphoma (BL), Diffuse large B cell Lymphoma (DLBCL), primary mediastinal large B cell lymphoma (PMLBL), follicular lymphoma, mature B cell leukemia.

Over the past decades clinical trials led to a significant improvement of event-free survival (EFS) in pediatric and adolescent patients with mature aggressive B-NHL. In Italy, the treatment regimen in use is AIEOP LNH-97 protocol. In the past years due to the success of the use of Rituximab in the treatment of NHL in adults some clinical trial investigated Rituximab for the treatment of pediatric B-NHL patients. Rituximab is a B-cell depleting agent.

Objectives: After Rituximab treatment a subset of adult patients developed prolonged hypogammaglobulinemia. This finding has not been characterized in detail in a pediatric population. This was a retrospective comparative study analyzing data of 118 pediatric patient treated for NHL in the past 20 years, in order to define the prevalence and clinical significance of hypogammaglobulinemia and its possible correlation with the use of Rituximab.

Design/Methods: Data concerning pediatric patients diagnosed with NHL between January 1999 and December 2021 and treated at the Pediatric Onco-hematology Unit of Padua University Hospital according to AIEOP LNH-97 protocol were collected retrospectively. Hypogammaglobulinemia was defined as a IgG serum level below 5 g/L.

Results: The study population included 118 patients (92 males and 26 females) with an average age at diagnosis of 10,2 years. The majority of patients presented with stage III (53,4%) and group risk 4 (46,6%).

55 patients received Rituximab: IgG lower than 5,00 g/L were found in 27 patients (49%) and 14 of them had an infectious episode.

30 patients (55%) received intravenous immunoglobulin replacement therapy soon after the end of treatment. 25 (45,5%) patients received immunoglobulin replacement therapy also after one year and 10 (18,2%) after two years.

We had analyzed infectious episodes in 55 patients, dividing them in 2 groups according to the IgG levels: among the first group (IgG levels $<5,00$ g/l) 14 had an infectious episode and 13 had not; among the second group (IgG > 5 g/l) instead, 8 had an infectious episode, while 20 had not. The statistical analysis conducted therefore demonstrated a lack of correlation between the IgG value and the occurrence of major infectious episode ($p=0.07$).

Relapse free survival was in the entire population 96% ($SE\pm 1$). No statistically significant differences were found by stratifying patients according to the risk group ($p=0.18$) and the number of infectious episodes ($p=0.22$).

Conclusion: Data review of a large pediatric cohort of NHL patient showed that hypogammaglobulinemia is a frequent finding during and after a chemotherapy treatment including Rituximab, and it might be associated with an increased risk of developing severe infectious complications. It is advisable that all the patients have a baseline measurement of serum immunoglobulins prior to initiation of Rituximab treatments. Levels should be monitored to detect long term changes. If hypogammaglobulinaemia is detected immunoglobulin replacement therapy should be considered.

2. INTRODUZIONE

2.1. Linfoma non Hodgkin pediatrico

I linfomi non Hodgkin (LnH) ¹ comprendono un gruppo eterogeneo di neoplasie derivanti dalla proliferazione monoclonale di cellule linfoidi nei siti linforeticolari: linfonodi, milza, fegato e tratto gastrointestinale.

In età pediatrica è possibile, sulla base di alcune caratteristiche istologiche e immunofenotipiche, identificare quattro gruppi principali:

- Linfomi a cellule B mature (LnH-B):
 - o Linfoma di Burkitt (LB), di cui si riconosce una forma endemica (associata a infezione da EBV) e una forma sporadica;
 - o Linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL);
 - o Linfoma primitivo mediastinico a grandi cellule B (PMLBL);
- Linfomi linfoblastici a cellule B o a cellule T (LnH-preB);
- Linfomi anaplastici a grandi cellule (ALCL);
- Altri linfomi con istologia rara.

2.2. Epidemiologia

Nell'insieme le neoplasie linfoidi rappresentano la terza causa di cancro dell'età pediatrica (0-14 anni), precedute solo dalle leucemie acute e dalle neoplasie del SNC, e la prima tra gli adolescenti (15-19 anni).

L'incidenza dei LnH è di circa 7-8 nuovi casi/1000000 bambini/anno. In Italia si registrano circa 70-80 nuovi casi/anno, con rapporto M:F di 3,1:1.

I dati USA riportano un'incidenza annuale in bambini di età inferiore ai 5 anni pari a 5,9/1000000 di abitanti. L'incidenza aumenta nei bambini di età compresa tra i 5 e i 14 anni (10/1000000) e raggiunge il suo valore massimo negli adolescenti (15/1000000).

Le forme maggiormente diagnosticate sono i LnH-B di alto grado: in particolare il LB costituisce il 40% dei LnH dell'età pediatrica, seguito dal DLBCL

(20%) mentre il PMLBL è il meno comune, rappresentando circa il 2% del totale delle diagnosi.²

Nella maggior parte dei casi l'eziologia è sconosciuta: si ritiene che possano avere un ruolo l'esposizione ad agenti infettivi (EBV, HTLV-1), a sostanze chimiche (pesticidi, fertilizzanti e solventi) e a radiazioni ionizzanti. La maggior parte dei bambini con diagnosi di linfoma non presenta però fattori di rischio riconosciuti.

Negli ultimi anni è stato reso chiaro il legame tra la presenza di uno stato severo di immunodeficienza e lo sviluppo di alcune di queste neoplasie, indipendentemente dall'origine congenita (Sindrome di Wiskott-Aldrich, sindrome da immunodeficienza combinata grave) o acquisita (HIV-correlata o farmaco-indotta) del deficit³.

2.3.LnH B pediatrici

2.3.1. Patogenesi

Le cellule linfoidi da cui originano i LnH⁴ sono sottoposte alla stessa regolazione biologica delle normali cellule B. I diversi istotipi di neoplasia originano da cellule a differenti stadi maturativi-differenziativi.

L'ontogenesi dei Linfociti B ha inizio a livello midollare dove la ricombinazione dei segmenti V, D, J permette l'assemblaggio delle catene leggere e pesanti delle Ig. In questo processo sono coinvolti due enzimi tradotti a partire dai geni RAG1 e RAG2, i quali mediano la rottura della doppia elica del DNA. Errori in questa fase possono contribuire alle traslocazioni cromosomiche che spesso si riscontrano alla base della patogenesi del linfoma.

Il processo maturativo prosegue poi a livello degli organi linfoidi secondari, sede della reazione del centro germinativo.

In particolare, negli organi linfoidi secondari la cellula B incontra l'antigene e, nell'area del tessuto linfoide ricca in cellule T, è attivata dall'interazione con i linfociti T CD4+, per dar vita alla reazione del centro germinativo.

Tale reazione prevede il verificarsi di due eventi, per i quali è importante l'azione dell'enzima deaminasi indotta dall'attivazione (AID⁵), che catalizza la deaminazione delle citosine trasformandole in uracile: l'ipermutazione somatica

(mutazione della regione variabile delle Ig con sviluppo di un linfocita con aumentata o diminuita affinità per un particolare antigene) e lo switch di classe delle Ig (passaggio dalla catena pesante IgM ad IgG, IgA, IgE). L'obiettivo finale è di generare linfociti B in grado di produrre immunoglobuline ad alta affinità per l'antigene. Completata la maturazione dal centro germinativo fuoriescono plasmacellule o cellule B della memoria.

A livello del centro germinativo si distinguono due zone: la zona scura, in cui sono presenti i centroblasti e la zona chiara, a livello della quale sono invece presenti i centrociti, cloni di centroblasti responsivi a uno stesso antigene. I centrociti possono poi evolvere a plasmacellule o cellule B della memoria o, talvolta, regredire a centroblasti (e conseguentemente rientrare nella zona scura).

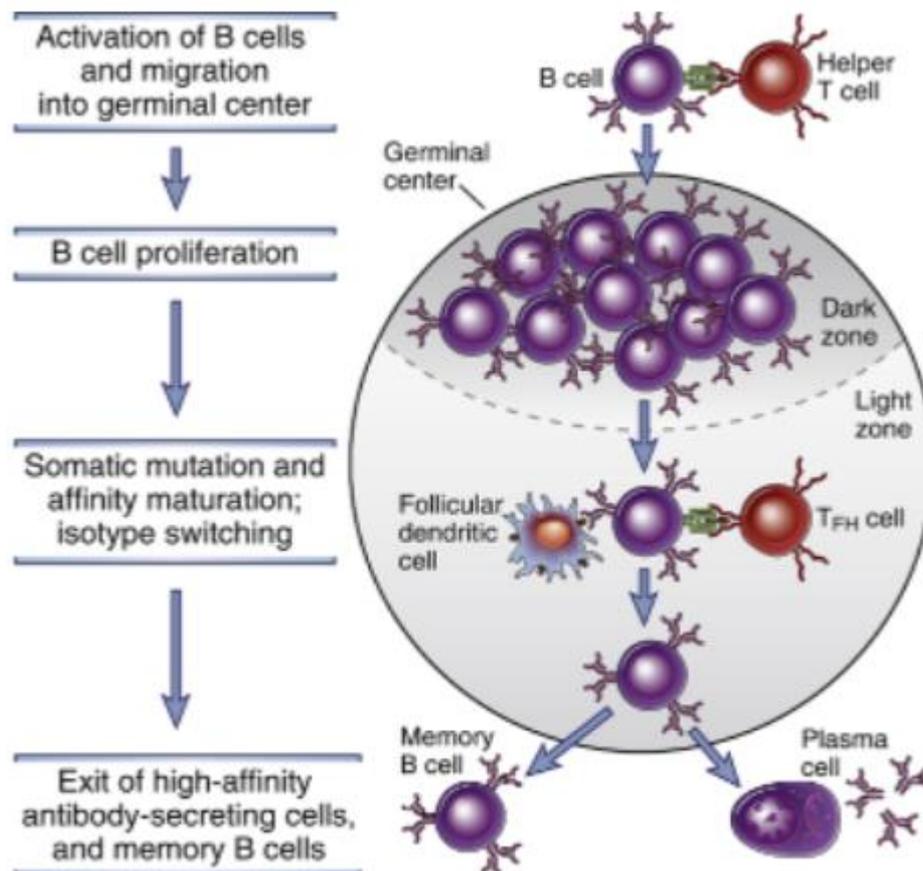


Figura 1: Reazione del centro germinativo³⁴

Tutti gli eventi che si verificano a livello linfocitario sono strettamente controllati da geni e programmi di segnalazione cellulare, selettivamente attivati a precisi stadi differenziativi del linfocita:

- l'oncogene MYC è espresso durante la formazione del centro germinativo, una sua repressione transitoria è seguita dalla riattivazione nei linfociti B che dalla zona chiara rientrano nella zona scura del centro germinativo. MYC agisce come induttore della proliferazione cellulare. La repressione dell'espressione è posta sotto il controllo del fattore di trascrizione BCL6, a sua volta dipendente da IRF8, IRF4 e MEF2B.⁶
- BCL6: importante fattore coinvolto nella repressione della trascrizione di molti geni. I geni da questo regolati determinano l'inibizione dell'arresto del ciclo cellulare e dell'apoptosi con creazione delle condizioni ideali affinché si possa creare e mantenere il centro germinativo.
- altri fattori di trascrizione importanti nel processo maturativo sono: MTA3, SPIB, BACH2, OCT2, OCAB.

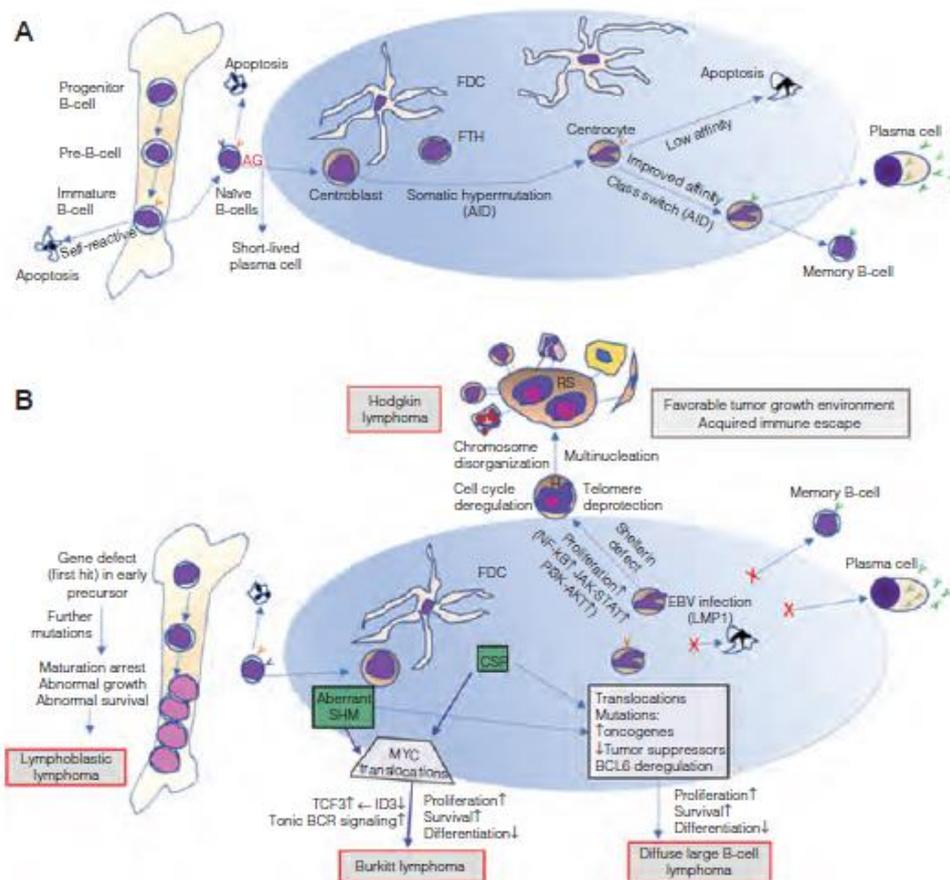
Nei LB si riscontra, nell'80% dei casi, la traslocazione dell'oncogene MYC (cromosoma 8q24) con un locus genico codificante per la catena pesante delle Ig (cromosoma 14q32); meno frequentemente invece la traslocazione coinvolge uno dei locus codificanti per le catene leggere lambda (cromosoma 22q11) o kappa (cromosoma 2p11). Come conseguenza di questa traslocazione si ha l'attivazione costitutiva dell'oncogene MYC, determinante progressione del ciclo cellulare, instabilità genomica e l'attivazione di programmi apoptotici endogeni. Nel 55% dei casi di LB pediatrico si è inoltre osservata la deregolazione del *pathway* apoptotico ARF-MDM2-p53.⁷

Istologicamente nel LB si riscontrano cellule di dimensioni intermedie con nucleo tondeggianti e scarso citoplasma con vacuoli lipidici. Il LB è una delle neoplasie con più alto indice proliferativo ed è spesso caratterizzato istologicamente dall'evidenza di figure mitotiche e corpi apoptotici, spesso fagocitati da macrofagi, determinante l'aspetto caratteristico "a cielo stellato".²

Il DLBCL è suddivisibile, dal punto di vista molecolare, in due diverse forme: GCB-DLBCL (germinal center B cell like-DLBCL) e ABC-DLBCL (activated B cell like-DLBCL). Nel paziente pediatrico è predominante la forma GCB.

Nel GCB-DLBCL si osserva l'espressione di BCL6 e CD10 e la presenza di geni delle Ig mutati, con ipermutazione somatica in corso. Si è dimostrato in un modello murino che l'assenza di AID previene lo sviluppo tumorale⁵.

L'istologia del DLBCL mostra un diffuso infiltrato di cellule di medie e grandi dimensioni che sovvertono l'intera struttura linfonodale.



**Figura 2: A. Normale sviluppo Linfociti B
B. Patogenesi linfomi B³⁵**

La diagnosi differenziale tra LB e DLBCL non è sempre immediata: il DLBCL non presenta traslocazioni cromosomiche caratteristiche e nel 5-10% dei casi è presente la traslocazione di MYC. L'aspetto immunofenotipico può essere identico nei due linfomi in ambito pediatrico. Infatti, entrambi esprimono gli antigeni CD20 e CD19, propri delle cellule B mature; solitamente entrambi esprimono gli antigeni CD10 e BCL6, segno della comune derivazione dal centro germinativo (LB deriva dai centroblasti, il DLBCL dai centrocyti). Un fattore che può invece aiutare è l'espressione di BCL2, rara nei LB e presente in circa il 40% dei casi di DLBCL.⁷

2.3.2. Associazione tra i disordini linfoproliferativi e condizioni di immunodeficit primitivo

Le immunodeficienze primitive (IDP)⁸ sono disordini congeniti che si esprimono con un ampio spettro di manifestazioni cliniche, prima su tutte l'aumentata suscettibilità alle infezioni. Negli ultimi anni si è osservato che frequentemente queste sono anche causa dell'insorgenza di un fenomeno di immunodisregolazione che si traduce con lo sviluppo di malattie linfoproliferative⁹, di cui i linfomi occupano il primo posto come incidenza, spesso quadro d'esordio e quindi prima manifestazione del deficit stesso. Come conseguenza molte volte i pazienti con IDP sono sottoposti a multiple biopsie per escludere la possibile degenerazione maligna.

L'introduzione di nuove tecniche di sequenziamento genico ha permesso di indagare geni e meccanismi patogenetici responsabili di queste forme: è sempre più frequente la richiesta di analisi genetiche in pazienti con linfoma nei quali è forte il sospetto che un IDP possa essere alla base della malattia stessa.

2.4. Presentazione clinica

La presentazione clinica dei LnH è variabile e dipendente dall'istologia, dalla sede di localizzazione primaria, dalle dimensioni e dallo stadio. Il 70% dei pazienti pediatrici alla diagnosi presenta una neoplasia allo stadio avanzato, spesso con coinvolgimento extranodale gastrointestinale, midollare e/o del SNC.

Il LB è diagnosticato principalmente in maschi di età media 9 anni. Frequentemente le manifestazioni sono a livello addominale, dei linfonodi cervicali e delle tonsille. Circa ¼ dei pazienti presenta coinvolgimento midollare alla diagnosi, mentre nel 5-10% dei casi si riscontra il coinvolgimento del SNC.¹⁰ In particolare, la forma sporadica si caratterizza per il coinvolgimento dell'addome o dei linfonodi cervicali. Nel 50% dei pazienti con forma endemica si riscontra la presenza di una massa mascellare. La neoplasia addominale si associa spesso a dolore, nausea e vomito a causa della diretta compressione del lume intestinale o come conseguenza dell'intussuscezione, soprattutto ileo-cecale.¹¹

In contrasto, il DLBCL è diagnosticato in pazienti di età media 11-12 anni con prevalenza solo lievemente sbilanciata nel sesso maschile (M:F=1,1:1). Il coinvolgimento midollare e del SNC sono raramente riscontrati nel DLBCL.⁷

La neoplasia può esordire con masse localizzate nel mediastino anteriore associate a tosse, ortopnea e respiro sibilante, masse addominali e coinvolgimento extranodale di cute, osso, tessuti molli, midollo osseo; più raramente è presente un interessamento del SNC al momento della diagnosi.

Le localizzazioni di malattia a carico del SNC costituiscono un fattore prognostico negativo sia nell'ambito del LB che dei DLBCL.

2.5.Diagnosi

Per la diagnosi¹² di LnH è necessaria l'analisi del tessuto ottenuto con biopsia della lesione o il campionamento ed esame citologico delle cellule tumorali prelevate dal liquido cefalorachidiano o da eventuali versamenti tramite toracentesi o paracentesi. Il campione prelevato è analizzato dal punto di vista istologico, citogenetico, immunofenotipico e molecolare.

In sospetto di linfoma le indagini comunemente eseguite alla diagnosi comprendono:

- emocromo completo con formula;
- elettroliti, acido urico, LDH, calcio, fosfato, creatinina;
- test di funzionalità epatica;
- aspirato midollare – biopsia;
- puntura lombare per prelievo di liquido cefalorachidiano su cui eseguire: analisi citologica, conta cellulare, glucosio, proteine.

Per completare il processo diagnostico e definire l'estensione di malattia sono eseguiti esami strumentali:

- RX torace;
- TC collo, torace, addome, pelvi: l'indagine consente di valutare i possibili compartimenti anatomici sede di malattia e di definire le dimensioni della massa e i margini;
- RMN cerebrale: indagine eseguita soprattutto per valutare il coinvolgimento del SNC e del midollo, come supporto all'analisi del liquor;
- in aggiunta, può essere eseguita PET o PET-TC o PET-RMN: il ruolo di questa indagine nella stadiazione iniziale dei LnH non è però ancora stato stabilito.

Nei pazienti con istologia compatibile con LB all'esordio è richiesta la ricerca della traslocazione $t(8;14)(q24;q32)$ mediante PCR nel midollo osseo per la definizione di malattia minima disseminata (MDD). Con MDD si definisce la quota di cellule blastiche presenti nel midollo osseo all'esordio di malattia, prima che il paziente inizi il trattamento chemioterapico. Uno studio dell'Associazione Italiana di Emato-oncologia Pediatrica (AIEOP) ha dimostrato come la presenza di MDD rappresenti un fattore prognostico negativo con un rischio relativo di recidiva pari a 4,7: i pazienti con MDD positiva all'esordio hanno un rischio di recidivare circa cinque volte maggiore rispetto ai pazienti con MDD negativa. Risulta importante anche il monitoraggio di Malattia minima residua (MMR) con cui si definisce la quota di cellule neoplastiche presenti nel midollo osseo o nel torrente circolatorio di un paziente durante le fasi di malattia. Lo studio AIEOP ha dimostrato che i pazienti che persistono positivi per MMR hanno un rischio di recidiva sei volte superiori rispetto ai negativi.¹³

2.5.1. Stadiazione di Murphy

Il sistema di stadiazione di riferimento per la classificazione dei LnH pediatrici è rappresentato dal sistema di stadiazione elaborato al St. Jude Children Hospital ed introdotto nel 1980 da Murphy SB.¹⁴ Questo sistema prevede una definizione dello stadio sulla base di: numero e distribuzione anatomica dei siti interessati dalla malattia, resecabilità della malattia, coinvolgimento di SNC e midollo osseo.

La stadiazione dettagliata è riportata nella figura 3 sottostante.

Table 1. Murphy Staging System	
Murphy Staging System	
Stage I	Single tumor (extranodal) or single anatomical area (nodal), with exclusion of mediastinum or abdomen
Stage II	Single tumor (extranodal) with regional node involvement \geq Two nodal areas on same side of diaphragm Two single (extranodal) tumors \pm regional node involvement on same side of diaphragm Primary GI tract tumor, usually in ileocecal area, \pm involvement of associated mesenteric nodes only*
Stage III	Two single tumors (extranodal) on opposite sides of diaphragm \geq Two nodal areas above and below diaphragm All primary intrathoracic tumor (mediastinal, pleural, thymic) All extensive primary intra-abdominal disease* All paraspinal or epidural tumors, regardless of other tumor sites
Stage IV	Any of above with initial involvement of CNS and/or bone marrow involvement†
NOTE. Data adapted. ¹⁵	
*Distinction is made between apparently localized GI tract lymphoma versus more extensive intra-abdominal disease because of their quite different patterns of survival after appropriate therapy. Stage II disease is typically limited to segment of gut \pm associated mesenteric nodes only, and primary tumor can be completely removed grossly by segmental excision. Stage III disease typically exhibits spread via lymphatics to para-aortic and retroperitoneal nodes via intra-peritoneal dissemination to form implants and plaques along mesentery or peritoneum or by direct infiltration of structures adjacent to primary tumor. Ascites may be present, and complete resection of all gross tumor is not possible.	
†If marrow involvement is present initially, No. of abnormal cells must be \leq 25% in otherwise normal marrow aspirate with normal peripheral blood picture.	

Figura 3: Stadiazione di Murphy

2.5.2. Stadiazione IPNHLSS (International Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma Staging System)

Nel 2015, grazie all'avanzamento delle metodiche diagnostiche è stato pubblicato da un comitato multidisciplinare di esperti in LnH pediatrici un sistema di stadiazione (stadiazione IPNHLSS) che include alcune precisazioni riguardanti le definizioni di stadio e che aggiunge nuove informazioni derivate dall'esecuzione in particolare di TC, PET-TC e PET-MRI (figura 4) ¹⁵.

International Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma Staging System
Stage I Single tumor with exclusion of mediastinum and abdomen (N; EN; B or S: EN-B, EN-S)
Stage II Single EN tumor with regional node involvement ≥ Two N areas on same side of diaphragm Primary GI tract tumor (usually in ileocecal area), ± involvement of associated mesenteric nodes, that is completely resectable (if malignant ascites or extension of tumor to adjacent organs, it should be regarded as stage III)
Stage III ≥ Two EN tumors (including EN-B or EN-S) above and/or below diaphragm ≥ Two N areas above and below diaphragm Any intrathoracic tumor (mediastinal, hilar, pulmonary, pleural, or thymic) Intra-abdominal and retroperitoneal disease, including liver, spleen, kidney, and/or ovary localizations, regardless of degree of resection (except primary GI tract tumor [usually in ileocecal region] ± involvement of associated mesenteric nodes that is completely resectable) Any paraspinal or epidural tumor, regardless of whether other sites are involved Single B lesion with concomitant involvement of EN and/or nonregional N sites
Stage IV Any of the above findings with initial involvement of CNS (stage IV CNS), BM (stage IV BM), or both (stage IV combined) based on conventional methods
NOTE. For each stage, type of examination and degree of BM and CNS involvement should be specified. Based on classification proposed by Murphy. ¹⁵ Abbreviations: B, bone; BM, bone marrow; EN, extranodal; N, nodal; S, skin.

Figura 4: Stadiazione IPNHLSS

Per definire il coinvolgimento del midollo osseo (BM) e del SNC sono riportate, nelle linee guida del sistema di stadiazione, alcune informazioni aggiuntive (figura 5):

Additional Staging Information
<p>BM Involvement</p> <p>Stage IV disease, resulting from BM Involvement, is currently defined by morphologic evidence of $\geq 5\%$ blasts or lymphoma cells by BM aspiration; this applies to any histologic subtype and will be maintained in IPNHLSS</p> <p>For each stage, type and degree of BM Involvement (by BM aspiration) should be specified, using abbreviations below to identify involvement:</p> <p>BMm: BM positivity by morphology (specify % lymphoma cells) BMi: BM positivity by immunophenotypic methods (immunohistochemical or flow-cytometric analysis; specify % lymphoma cells) BMc: BM positivity by cytogenetic or FISH analysis (specify % lymphoma cells) BMmol: BM positivity by molecular techniques (PCR based; specify level of involvement)</p> <p>Same approach should be used for PB Involvement (Ie, PBm, PBI, PBc, PBmol)</p> <p>Definition of BM Involvement should be obtained from analysis of bilateral BM aspirates and BM biopsy</p>
<p>CNS Involvement</p> <p>CNS is considered involved in case of:</p> <ul style="list-style-type: none"> Any CNS tumor mass (identified by imaging techniques [Ie, CT, MRI]) Cranial nerve palsy that cannot be explained by extradural lesions Blasts morphologically identified in CSF <p>Condition that defines CNS positivity should be specified: CNS positive/mass, CNS positive/palsy, CNS positive/blasts</p> <p>CSF status: CSF positivity is based on morphologic evidence of lymphoma cells</p> <p>CSF should be considered positive when any No. of blasts is detected</p> <p>CSF unknown (not performed, technical difficulties)</p> <p>Similarly to BM, type of CSF involvement should be described whenever possible</p> <p>CSFm: CSF positivity by morphology (specify No. of blasts/μL) CSFi: CSF positivity by immunophenotype methods (immunohistochemical or flow cytometric analysis; specify % lymphoma cells) CSFc: CSF positive by cytogenetic or FISH analysis (specify % lymphoma cells) CSFmol: CSF positivity by molecular techniques (PCR based; specify level of involvement)</p>
<p>NOTE. Until sufficient data are available, PET should be used with caution for staging, and PET results should be compared and discussed in light of other more consolidated imaging approaches.</p> <p>Abbreviations: BM, bone marrow; CT, computed tomography; FISH, fluorescent in situ hybridization; IPNHLSS, International Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma Staging System; MRI, magnetic resonance imaging; PB, peripheral blood; PBc, PB positivity by cytogenetic or FISH analysis; PBI, PB positivity by immunophenotype methods; PBm, PB positivity by morphology; PBmol, PB positivity by molecular techniques; PCR, polymerase chain reaction; PET, positron emission tomography.</p>

Figura 5: Informazioni aggiuntive per definire lo stadio secondo la stadiazione IPNHLSS

2.6. Trattamento del LnH pediatrico: protocollo AIEOP LNH-97

Il protocollo AIEOP LNH-97 per il trattamento dei LnH è stato sviluppato dall'Associazione Italiana di Emato-Oncologia Pediatrica con l'obiettivo di incrementare EFS (event free survival) e ridurre le morti causate dalla tossicità dei farmaci utilizzati nei protocolli precedenti (AIEOP LNH-92).

2.6.1. Stratificazione del rischio e schema terapeutico

Ciascun paziente con LnH candidabile a trattamento basato sul protocollo AIEOP LNH-97 è stratificato secondo quattro classi di rischio definite dal valore di LDH pre-trattamento, dallo stadio e dall'entità della resezione chirurgica. Lo schema terapeutico è definito dalla classe di rischio a cui è assegnato il paziente, come riportato dallo schema sottostante (figura 6,7; tabella I, II)¹⁶:

R1	Stage I or II, completely resected	A	B					
R2	Stage I or II, not completely resected Stage III and LDH < 500 iu/l	P	A	B	A	B		
R3	Stage III and LDH ≥ 500 and < 1000 iu/l Stage IV and LDH < 1000 iu/l and CNS negative	P	AA	BB	CC	AA	BB	
R4	Stage III and LDH ≥ 1000 iu/l Stage IV and LDH ≥ 1000 iu/l and CNS negative CNS positive	P	AA	BB	CC	AA	BB	CC

Figura 6: Schema di trattamento secondo il gruppo di rischio, Protocollo AIEOP LNH-97

R2	Stage I and II, not completely resected Stage III and LDH < 500 IU/l	Ritux*	Ritux*	Ritux*	Ritux*		
R3	Stage III and LDH ≥ 500 IU/l and < 1000 IU/l Stage IV and LDH < 1000 IU/l and CNS negative	Ritux*	Ritux*	Ritux*	Ritux*	Ritux*	
R4	Stage IV and LDH > 1000 IU/l Stage IV and LDH ≥ 1000 IU/l and CNS negative CNS positive	Ritux*	Ritux*	Ritux*	Ritux*	Ritux*	Ritux*

* For first course AA, rituximab infusion on day 0 corresponded to day 5 of prephase

Figura 7: Schema di trattamento secondo il gruppo di rischio, Protocollo AIEOP LNH-97 + Rituximab

Drug	Dose	Days				
		1	2	3	4	5
<u>PREPHASE</u>						
Dexamethasone orally/IV [^]	mg/sqm	5	5	10	10	10
Cyclophosphamide IV (1 h)	200 mg/sqm/day	x	x			
MTX+ARA-C+PDN IT	12 mg +30mg+10mg*	x				
<u>CYCLE A</u>						
Dexamethasone orally/IV [^]	10 mg/sqm	x	x	x	x	x
Vincristine IV [°]	1.5 mg/sqm	x				
Methotrexate IV [§]	1 g/sqm	x				
Ifosfamide IV (1 h)	800 mg/sqm ²	x	x	x	x	x
Etoposide IV (2 h)	100 mg/sqm				x	x
Cytarabine IV (1 h)	150 mg/sqm				x -x [°]	x -x [°]
MTX+ARA-C+PDN IT	12 mg +30mg+10mg*	x				
<u>CYCLE B</u>						
Dexamethasone orally/IV [^]	10 mg/sqm	x	x	x	x	x
Vincristine IV [°]	1.5 mg/sqm	x				
Methotrexate IV [§]	1 g/sqm	x				
Cyclophosphamide IV (1 h)	200 mg/sqm/day	x	x	x	x	x
Doxorubicin IV (4 h)	25 mg/sqm				x	x
MTX+ARA-C+PDN IT	12 mg +30mg+10mg*	x				
<u>CYCLE AA</u>						
Dexamethasone orally/IV [^]	10 mg/sqm	x	x	x	x	x
Vincristine IV [°]	1.5 mg/sqm	x				
Methotrexate IV [§]	5 g/sqm	x				
Ifosfamide IV (1 h)	800 mg/sqm	x	x	x	x	x
Etoposide IV (2 h)	100 mg/sqm				x	x
Cytarabine IV (1 h)	150 mg/sqm				x -x [°]	x -x [°]
MTX+ARA-C+PDN IT	12 mg +30mg+10mg*	x				
<u>CYCLE BB</u>						
Dexamethasone orally/IV [^]	10 mg/sqm	x	x	x	x	x
Vincristine IV [°]	1.5 mg/sqm	x				
Methotrexate IV [§]	5 g/sqm	x				
Cyclophosphamide IV (1 h)	200 mg/sqm/day	x	x	x	x	x
Doxorubicin IV (4 h)	25 mg/sqm				x	x
MTX+ARA-C+PDN IT	12 mg +30mg+10mg*	x				
<u>CYCLE CC</u>						
Dexamethasone orally/IV [^]	20 mg/sqm	x	x	x	x	x
Vindesine IV [°]	3 mg/sqm	x				
Cytarabine IV (3 h)	3 g/sqm	x -x [°]	x -x [°]			
Etoposide IV (2 h)	100 mg/sqm				x	x
Mtx+ARA-C+PDN IT	12 mg +30mg+10mg*	x				
<u>CYCLE AA[±] and BB[±] and CC[±]</u>						
Mtx+Pdn IT	6 mg +5mg*	x		x		
MTX+ARA-C+PDN IT	6 mg +30mg+5mg*					x

Tabella I: Protocollo AIEOP LNH-97; MTX=metotrexate; ARA-C=cytarabine; PDN=prednisolone; IV=intravenously; h=hours; intrathecal (IT); CNS=central nervous system. [^] Subdivided in 3 doses. * Dose of IT chemotherapy was age-adjusted for children less than 3 years. In cycles A, B, AA and BB, IT therapy is administered 2 h after beginning of MTX IV. [°]Maximum dose is 2 mg. [§] 10% of MTX dose is given in 0.5 h, 90% of dose over 23.5 h. L-leucovorin rescue IV is 15 mg/sqm at h 42, 7.5 mg/sqm at h 48, and 54 after beginning of MTX. [°]Doses are 12 h apart. [±]Cycles AA, BB and CC for CNS positive patients are the same as AA, BB and CC, respectively, with the exception of IT therapy listed.

Drug	Dose	Days					
		0	+1	+2	+3	+4	+5
<u>PREPHASE</u>							
Dexamethasone orally/IV [^]	mg/sqm		5	5	10	10	10
Cyclophosphamide IV (1 h)	200 mg/sqm/day		x	x			
MTX+ARA-C+PDN IT	12 mg +30mg+10mg*		x				
<u>COURSE A</u>							
Rituximab IV [”]	375 mg/sqm	x					
Dexamethasone orally/IV [^]	10 mg/sqm		x	x	x	x	x
Vincristine IV ^ç	1,5 mg/sqm		x				
Methotrexate IV [§]	1 g/sqm		x				
Ifosfamide IV (1h)	800 mg/sqm ²		x	x	x	x	x
Etoposide IV (2h)	100 mg/sqm					x	x
Cytarabine IV (1h)	150 mg/sqm					x-x [°]	x-x [°]
MTX+ARA-C+PDN IT	12 mg+30mg+10mg*		x				
<u>COURSE B</u>							
Rituximab IV [”]	375 mg/sqm	x					
Dexamethasone orally/IV [^]	1,5 mg/sqm		x	x	x	x	x
Vincristine IV ^ç	1 g/sqm		x				
Methotrexate	200 mg/sqm/day		x				
Cyclophosphamide IV (1h)	25 mg/sqm		x	x	x	x	x
Doxorubicina IV (4h)	12 mg+30mg+10mg*					x	x
MTX+ARA-C+PDN-IT			x				
<u>COURSE AA</u>							
Rituximab IV [”]	375 mg/sqm	x [#]					
Dexamethasone orally/IV [^]	10 mg/sqm		x	x	x	x	x
Vincristine IV ^ç	1.5 mg/sqm		x				
Methotrexate IV [§]	5 g/sqm		x				
Ifosfamide IV (1 h)	800 mg/sqm		x	x	x	x	x
Etoposide IV (2 h)	100 mg/sqm					x	x
Cytarabine IV (1 h)	150 mg/sqm					x-x [°]	x-x [°]
MTX+ARA-C+PDN IT	12 mg +30mg+10mg*		x				
<u>COURSE BB</u>							
Rituximab IV [”]	375 mg/sqm	x [#]					
Dexamethasone orally/IV [^]	10 mg/sqm		x	x	x	x	x
Vincristine IV ^ç	1.5 mg/sqm		x				
Methotrexate IV [§]	5 g/sqm		x				
Cyclophosphamide IV (1 h)	200 mg/sqm/day		x	x	x	x	x
Doxorubicin IV (4 h)	25 mg/sqm					x	x
MTX+ARA-C+PDN IT	12 mg +30mg+10mg*		x				
<u>COURSE CC</u>							
Rituximab IV [”]	375 mg/sqm	x					
Dexamethasone orally/IV [^]	20 mg/sqm		x	x	x	x	x
Vindesine IV ^ç	3 mg/sqm		x				
Cytarabine IV (3 h)	3 g/sqm		x-x [°]	x-x [°]			
Etoposide IV (2 h)	100 mg/sqm					x	x
Mtx+ARA-C+PDN IT	12 mg +30mg+10mg*		x				
<u>COUSE AA[±] and BB[±] and CC[±]</u>							
Mtx+Pdn IT	6 mg +5mg*		x		x		
MTX+ARA-C+PDN IT	6 mg +30mg+5mg*						x

Tabella II: Protocollo AIEOP LNH-97+Rituximab; MTX=methotrexate; ARA-C=cytarabine; PDN=prednisolone; IV=intravenously; h=hours; intrathecal (IT); CNS=central nervous system. [^] Subdivided in 3 doses. * Dose of IT chemotherapy was age-adjusted for children less than 3 years. In courses AA and BB, IT therapy was administered 2 h after beginning of MTX IV. ^çMaximum dose was 2 mg. [§] 10% of MTX dose was given in 0.5 h, 90% of dose over 23.5 h. L-leucovorin rescue IV was 15 mg/sqm at h 42, 7.5 mg/sqm at h 48, and 54 after beginning of MTX. [°]Doses were 12 h apart. +Courses AA, BB and CC for CNS positive patients were the same as AA, BB and CC, respectively, with the exception of IT therapy listed. # For first course AA, rituximab infusion on day 0 corresponded to day 5 of prephase. [”] Rituximab was administrated to patients according to treating centers' decision. The administration of the first and the subsequent infusions of rituximab followed the summary of product characteristics.

2.7. Prognosi

Secondo quanto pubblicato sul manuale “Lanzkowsky’s Manual of Pediatric Hematology and Oncology” in bambini con diagnosi allo stadio I-II si registra una EFS a due anni dalla diagnosi compresa tra 85 e 98%. In caso di diagnosi allo stadio III questa risulta di 85-90%, equivalente alla sopravvivenza che si riscontra in pazienti con stadio IV con coinvolgimento midollare. Al contrario, questa si riduce a circa l’80% in caso di stadio IV con coinvolgimento del SNC¹².

Lo studio italiano condotto dal nostro centro tra Ottobre 1997 e Giugno 2014 e pubblicato nel 2016 sul *British Journal of Hematology* con il titolo “Detection of prognostic factors in children and adolescents with Burkitt and Diffuse Large B-Cell Lymphoma treated with the AIEOP LNH-97 protocol”¹⁶ ha permesso di definire OS (overall survival) e EFS in 442 pazienti trattati secondo il protocollo AIEOP LNH-97.

In particolare, a un *follow-up* medio di 5 anni (*range* 0,05-15,1 anni) OS era pari a 93% (± 1) e EFS pari a 90% (± 1). Nel dettaglio, a seconda del gruppo di rischio, si è registrata EFS pari a: 100% (R1), 96% ± 2 (R2), 90% ± 3 (R3) e 81% ± 3 (R4). A seconda dello stadio si è registrata EFS pari a: 100% (Stadio I), 95% (Stadio II), 88% (Stadio III), 75% (Stadio IV). I risultati di questo studio hanno determinato il passaggio al protocollo AIEOP LNH-97, più intensivo rispetto al precedente.

Questi dati fanno riferimento a pazienti trattati senza l’aggiunta di Rituximab.

Lo studio “Rituximab for High-Risk, Mature B-Cell Non-Hodgkin’s Lymphoma in Children”¹⁷ pubblicato nel 2020 ha permesso di dimostrare un importante aumento di EFS e OS in pazienti con LnH-B di alto grado. Nello specifico, è stato condotto uno studio internazionale che ha coinvolto 12 nazioni, randomizzato di fase tre, nel periodo compreso tra Dicembre 2011 e Novembre 2015, con lo scopo di stabilire se l’aggiunta di Rituximab al classico protocollo chemioterapico determinasse un importante miglioramento in termini di EFS. Lo studio ha analizzato la sicurezza e l’efficacia dell’aggiunta di Rituximab in 328 pazienti di età compresa tra 6 mesi e 18 anni con diagnosi di LnH-B di alto grado (esclusi i pazienti con diagnosi di PMLBL) allo stadio III con LDH < 2 volte il valore normale e in stadio IV secondo Murphy. Tutti i pazienti selezionati sono stati trattati secondo il protocollo FAB/LBM96 con l’aggiunta di un’infusione endovena di 375 mg/m² di Rituximab due giorni prima e al giorno uno dei due cicli di induzione e al giorno uno dei due cicli di consolidamento, per un totale di sei dosi.

L'analisi dei dati ha permesso di dimostrare un miglioramento di EFS, risultata pari al 93,9% (confrontato con 82,3% nel gruppo che non ha ricevuto Rituximab), e di OS, risultata pari a 95,1% (confrontata con 87,3% nel gruppo che non ha ricevuto Rituximab) tramite l'aggiunta del Rituximab, nonostante i possibili effetti collaterali del farmaco stesso¹⁸. Grazie a questo studio internazionale, unico al momento pubblicato, Rituximab è stato approvato e introdotto nel protocollo terapeutico di pazienti pediatrici con diagnosi di LnH-B di alto grado. Sono attualmente in corso ulteriori studi volti anche a indagare gli effetti collaterali di Rituximab.

2.8. Rituximab

Rituximab¹⁹ è un anticorpo monoclonale chimerico murino/umano utilizzato nei protocolli di trattamento di alcune neoplasie ematologiche dell'adulto e del bambino e che trova applicazione anche in altri ambiti della medicina.

L'anticorpo agisce causando la deplezione di cellule B esprimenti CD-20. La deplezione è indotta da diversi meccanismi:

- tossicità diretta;
- citotossicità complemento dipendente;
- citotossicità cellulare mediata da anticorpi;
- fagocitosi da parte delle cellule del sistema reticolo endoteliale.

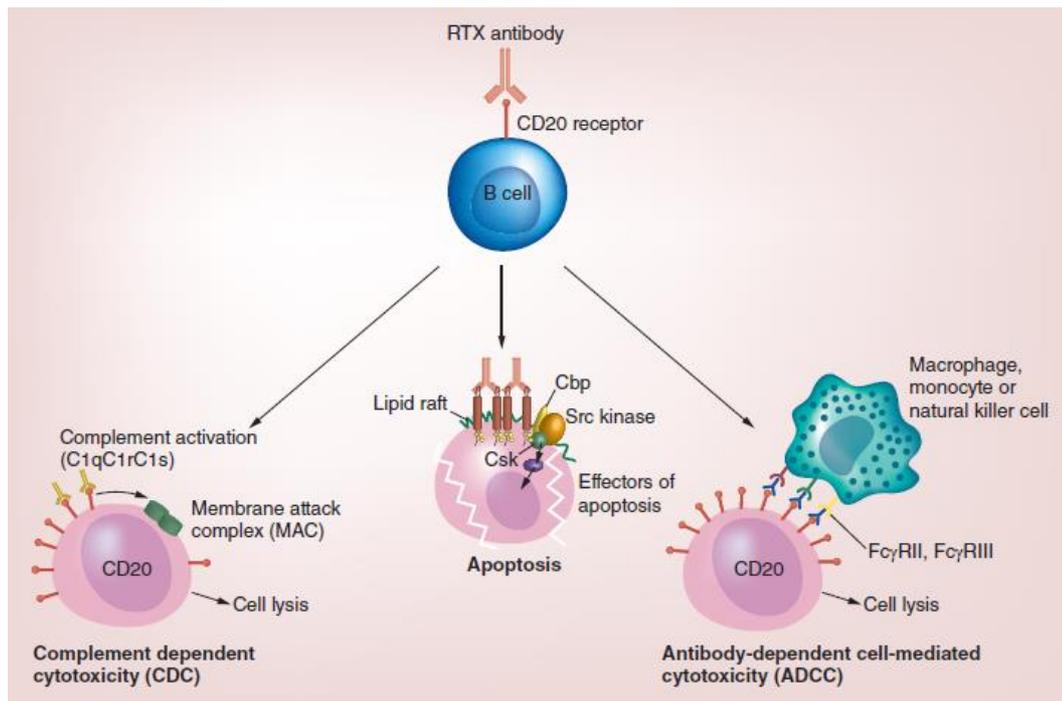


Figura 8: Meccanismo d'azione Rituximab³⁶

Le cellule B possono rimanere assenti dal circolo periferico per un periodo variabile, tipicamente compreso tra i 6 e i 12 mesi. La rimozione dal circolo di linfociti B maturi CD20 positivi, precursori di plasmacellule secernenti anticorpi, è considerato l'effetto principale del farmaco.

Gli effetti collaterali possono essere suddivisi a seconda della gravità²⁰:

- reazioni lievi-moderate correlate all'infusione: febbre, brividi e rigor sono stati registrati in alcuni pazienti durante la prima somministrazione. Altri frequenti sintomi rilevati sono: nausea, prurito, angioedema, ipotensione, broncospasmo, irritazione della gola, rinite, orticaria, mialgia, cefalea, vertigine e ipertensione. Nella maggior parte dei casi queste reazioni si sono manifestate in un tempo compreso tra 30 e 120 minuti post infusione. Tipicamente questi si sono risolti con trattamento sintomatico associato a interruzione della somministrazione. La premedicazione con paracetamolo ed antistaminico può ridurre la probabilità di effetti collaterali infusione-correlati;
- effetti collaterali severi: reazioni muco-cutanee, riattivazione HBV ed epatite fulminante conseguente, leucoencefalopatia multifocale progressiva, riattivazione di infezioni virali, aritmie cardiache, tossicità renale,

ostruzione/perforazione intestinale, disordini ematologici (linfopenia, neutropenia, anemia). Questi sono stati registrati maggiormente tra coloro che ricevevano la terapia per cause neoplastiche, bambini, anziani e coloro che avevano ricevuto alte dosi di regimi immunosoppressivi prima di iniziare la terapia con rituximab.

Per quanto riguarda la neutropenia, citata tra gli effetti collaterali severi, negli ultimi anni sono stati pubblicati alcuni studi, effettuati su pazienti pediatrici o adulti, volti a sottolineare questa problematica.

In particolare, la neutropenia indotta da Rituximab è definita da una conta assoluta di neutrofili $<1,5 \cdot 10^9/l$ insorta entro 12 mesi dal trattamento.

Gli studi pubblicati con riferimento a pazienti pediatrici indagano l'effetto collaterale in pazienti trattati per patologie non ematologiche, in particolare per patologie reumatologiche o per il trattamento di sindrome nefrosica refrattaria ai corticosteroidi. Secondo i dati riportati in letteratura la neutropenia indotta da Rituximab si manifesta in una percentuale di pazienti compresa tra il 5 e il 33% con maggior incidenza in coloro che contemporaneamente erano trattati con altri farmaci immunosoppressivi, tra cui ciclosporina e steroidi. La durata media del quadro era pari a 3 giorni. L'età mediana di insorgenza era pari a 6,4 anni, più bassa rispetto a quella di coloro che non hanno manifestato l'effetto collaterale, pari a 12.5.

I pazienti nei quali è stata riscontrata neutropenia sono stati tutti trattati mediante l'infusione di fattore di crescita granulocitario (G-CSF). Non si sono registrati eventi infettivi severi o aumento di mortalità²¹.

Attualmente non sono stati pubblicati studi relativi allo sviluppo di neutropenia in pazienti pediatrici con diagnosi di linfoma trattati con Rituximab.

I dati registrati nell'adulto²² trattato per patologie neoplastiche dimostrano un aumento dell'incidenza di neutropenia pari a 3-27% in pazienti che hanno assunto Rituximab, con durata media del quadro pari a circa 12 giorni e insorgenza media dopo 77 giorni dall'infusione. Nonostante la neutropenia non si è registrato importante aumento del rischio infettivo o della mortalità.

Negli ultimi anni sono stati pubblicati studi volti a indagare la correlazione tra la terapia con Rituximab e lo sviluppo di una seconda neoplasia^{23,24}, con particolare attenzione allo sviluppo di melanoma^{25, 26}, linfomi e alcune forme di leucemia.²⁷ Non è ancora noto il meccanismo patogenetico alla base ma gli studi pubblicati

sottolineano l'importanza di un attento follow up allo scopo di identificare precocemente lesioni sospette.

2.8.1. Ipogammaglobulinemia post-rituximab nell'adulto

A seguito dell'importante utilizzo del farmaco Rituximab nell'adulto si è osservato un incremento del numero di pazienti che hanno sviluppato ipogammaglobulinemia prolungata e sintomatica. Questa osservazione ha aperto la strada ad alcuni studi volti a individuare la popolazione maggiormente suscettibile.

Lo studio "Association of Immunoglobulin Levels, Infectious Risk, and Mortality With Rituximab and Hypogammaglobulinemia"²⁸ in particolare, ha valutato l'associazione tra i livelli di Ig classe IgG nel pre e post trattamento di pazienti con patologie reumatologiche ed ematologiche e l'associazione di questi con le infezioni contratte dai pazienti, con l'obiettivo di definire la necessità di monitoraggio dei livelli di Ig così da poter ridurre il rischio infettivo e di complicanze.

L'ipogammaglobulinemia è stata definita da livelli sierici di IgG <600 mg/dl: in particolare, è definita lieve con livelli compresi tra 400 e 599 mg/dl, moderata se compresi tra 200 e 399 mg/dl e severa se <199 mg/dl.

I pazienti inclusi nello studio sono stati seguiti con lo scopo di esaminare l'insorgenza di complicanze infettive e l'eventuale morte ad esse correlate nei sei mesi successivi all'infusione di Rituximab, con confronto con il tasso di insorgenza delle complicanze anche nei sei mesi precedenti all'inizio della terapia. I pazienti parte dello studio sono stati stratificati secondo la patologia primaria per la quale il farmaco era stato prescritto (neoplasie, malattie reumatologiche, patologie ematologiche, COVID).

I risultati dello studio hanno dimostrato un peggioramento dei livelli di IgG post-trattamento confrontati con i livelli pre-trattamento, con incremento del numero di infezioni. Inoltre, si è osservato che pazienti con bassi livelli di IgG nel pre-trattamento con Rituximab hanno sviluppato ipogammaglobulinemia più severa se confrontata con quella di pazienti con livelli più alti nel pre-trattamento. Questa osservazione ha portato a definire la necessità dello screening dei livelli di immunoglobuline così da poter identificare i pazienti maggiormente a rischio.

Lo studio ha inoltre valutato la necessità di introdurre la supplementazione con immunoglobuline somministrate per via endovenosa allo scopo di ridurre il rischio infettivo dimostrando effettivamente una diminuzione di questo nei pochi pazienti a cui sono state somministrate. Non esiste, ad oggi, un valore di IgG tale per cui possa essere definita con certezza la necessità di somministrare immunoglobuline, ma ogni caso viene singolarmente valutato.

2.8.2. Ipogammaglobulinemia post-rituximab nel paziente pediatrico

Come conseguenza dell'uso sempre maggiore dell'anticorpo monoclonale Rituximab anche nella terapia di diverse patologie in pazienti pediatriche sono stati avviati degli studi volti a indagare gli effetti collaterali anche in questa popolazione target, con particolare attenzione al deficit di Ig e alle sue conseguenze.

Lo studio "Rituximab-induced hypogammaglobulinemia and infection risk in pediatric patients"²⁹ riporta i dati relativi a pazienti pediatriche trattati con Rituximab per malattie neoplastiche e non e focalizza l'attenzione sul deficit di immunoglobuline secondario alla terapia stessa, escludendo dall'analisi i pazienti nei quali prima dell'inizio della terapia si è riscontrato un livello di IgG al di sotto della soglia di normalità e i pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali, essendo questo importante fattore di rischio per ipogammaglobulinemia. Oltre al riscontro dei deficit di IgG, IgM e IgA lo studio ha indagato anche il verificarsi di eventi infettivi correlati, la presenza di eventuali fattori di rischio e la cinetica di crescita dei linfociti B.

Come nell'adulto, i risultati dello studio hanno dimostrato un aumento del numero di pazienti con ipogammaglobulinemia post Rituximab e un'associazione tra i bassi livelli di IgG e l'aumentato rischio infettivo, associazione non dimostrata in relazione ai bassi livelli di IgM e IgA. L'ipogammaglobulinemia persistente (definita dallo studio come il riscontro di valori di IgG al di sotto della soglia di normalità, calcolata sulla base dell'età del paziente, a un anno dal termine della terapia) è stata maggiormente riscontrata nei pazienti che già prima dell'inizio della terapia presentavano un valore basso di Ig.

3. SCOPO ED OBIETTIVI DELLO STUDIO

Sebbene siano noti gli effetti collaterali del Rituximab nell'adulto, sono pochi gli studi che hanno valutato il verificarsi di questi nel paziente pediatrico.

A seguito dell'introduzione nella terapia dei pazienti pediatrici del Rituximab si è osservato un incremento del numero di pazienti con deficit di Ig.

Il nostro centro ha condotto uno studio retrospettivo comparativo che ha valutato una popolazione composta da pazienti pediatrici seguiti presso il reparto di Oncoematologia pediatrica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova nel periodo compreso tra Gennaio 1999 e Dicembre 2021 con diagnosi di LnH-B trattati secondo il protocollo AIEOP LNH-97, con o senza l'aggiunta di Rituximab. Tutti i pazienti arruolati nel protocollo avevano fornito il consenso informato al trattamento secondo le direttive aziendali.

Per questo studio sono stati analizzati i dati clinici e bioumorali dei pazienti con i seguenti obiettivi:

- confrontare i valori di Ig prima dell'inizio della terapia, con lo scopo di identificare eventuali deficit già presenti, con i valori a distanza di uno e due anni dalla diagnosi;
- registrare eventuali eventi infettivi maggiori e verificare una relazione con i livelli di Ig;
- registrare i casi in cui si è resa necessaria la supplementazione di Ig endovena e il tempo intercorso prima della normalizzazione dei valori;
- confrontare, tramite studio comparativo, i dati dei pazienti trattati con e senza Rituximab.

4. PAZIENTI, MATERIALI E METODI

4.1. Selezione dei pazienti e criteri di inclusione

Lo studio si è basato sull'analisi retrospettiva comparativa dei dati di pazienti pediatrici con diagnosi di LnH-B nel periodo di tempo compreso tra Gennaio 1999 e Dicembre 2021 presso il reparto di Oncoematologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Padova. Si sono analizzati anche i dati di alcuni pazienti la cui diagnosi era stata effettuata in un centro esterno, poi trasferiti presso il nostro reparto per l'inizio delle cure.

I dati sono stati estrapolati dalle cartelle cliniche conservate presso l'archivio del reparto di Oncoematologia Pediatrica all'interno dell'Azienda Ospedaliera e presso l'archivio centrale con sede a Camin. I dati specifici per questa analisi sono stati raccolti e inseriti in file Excel, nel rispetto dell'anonimato, e successivamente implementati con i dati clinici presenti nell'archivio Access precedentemente creato per la gestione del protocollo e gestito dal centro di Oncoematologia Pediatrica dell'Azienda Ospedaliera.

Per lo studio sono stati rispettati i seguenti criteri di inclusione:

- età compresa tra 6 mesi e 18 anni;
- diagnosi di LnH-B trattato secondo il protocollo AIEOP LNH-97 con o senza l'aggiunta di Rituximab;
- disponibilità di dati anagrafici e clinico-laboratoristici completi;
- *follow-up* clinico uguale o superiore a sei mesi.

I criteri di inclusione sono stati soddisfatti in 118 casi su 126 inizialmente analizzati:

- quattro pazienti sono stati esclusi poiché deceduti per complicanze non legate a Rituximab;
- due pazienti sono stati esclusi perché persi al *follow-up*;
- due pazienti sono stati esclusi poiché trattati solo chirurgicamente senza necessità di chemioterapia.

Nel database sono stati riportati per ogni paziente i seguenti dati:

- sesso;
- data di nascita;
- data di diagnosi;
- età al momento della diagnosi;
- presenza o assenza di sintomi B alla diagnosi: febbre, sudorazione notturna, calo ponderale;
- sottotipo istologico: LB, DLBCL, PMLBL, LB leucemizzato, LnH-B inclassificabile;
- sede di malattia;
- stadio;
- gruppo di rischio;
- valori di IgG, IgA, IgM al momento della diagnosi;
- data di inizio e stop terapia ed eventuali ritardi rispetto alle tempistiche stabilite dal protocollo;
- somministrazione o meno di Rituximab e numero di dosi;
- effetti collaterali del trattamento;
- eventi infettivi durante il trattamento e nel *follow-up* e patogeni responsabili;
- per i pazienti che hanno ricevuto Rituximab:
 - valori di IgG, IgA, IgM alla fine della terapia e a distanza di uno e due anni;
 - necessità di supplementazione di Ig endovena;
- situazione clinica alla fine della terapia: data di remissione completa o di eventuale ricaduta con necessità di terapie di seconda linea.

4.2. Dosaggio di IgG

Il dosaggio di IgG è effettuato su sangue intero prelevato e conservato in provetta senza aggiunta di anticoagulanti. Il siero, una volta prelevato, può essere mantenuto refrigerato (tra +2 e +8°C) se analizzato entro 8 giorni, altrimenti deve essere congelato (T < -20°C).

L'analisi è effettuata con metodo immunonefelometrico.

I valori di riferimento suddivisi a seconda dell'età sono riportati nella Figura 9.

Sesso											
Età	1M	3M	6M	1A	2A	4A	7A	10A	13A	15A	Max
Limite Inferiore	6,40	2,29	1,61	2,97	4,42	4,25	5,52	6,20	6,54	6,80	7
Limite Superiore	12,70	6,63	7,31	10,03	9,18	11,56	11,98	11,98	12,84	14,45	16

Età: G = Giorni, S = Settimane, M = Mesi, A = Anni; Max = Di età superiore all'ultimo valore riferito al sesso

Figura 9: Intervalli di riferimento IgG, <https://www.medlabpd.it/>

4.3. Analisi statistica

Per l'analisi statistica univariata sono stati utilizzati il test Chi-quadrato o il test di Fisher per le variabili quantitative e il test T di Student per le variabili continue, al fine di valutare le possibili differenze di distribuzione nei gruppi confrontati.

È stata condotta un'analisi di sopravvivenza libera da recidiva (RFS) al fine di confrontare se l'uso del Rituximab ha causato un eccesso di infezioni tali da ritardare il timing delle terapie e quindi poter determinare un maggior numero di ricadute, rispetto al gruppo no Rituximab. Inoltre, è stata valutata la RFS per gruppi di rischio per i pazienti trattati senza e con Rituximab.

La RFS, valutata a 6 anni, è stata calcolata a partire dalla data della diagnosi fino alla data del primo evento (progressione di malattia o recidiva) o fino alla data dell'ultimo *follow-up*.

Le analisi di RFS sono state eseguite utilizzando il metodo di Kaplan-Meier ed espresse in percentuale insieme al relativo errore standard, la differenza tra le curve è stata stimata con il log-rank test. I pazienti persi al *follow-up* sono stati censurati al momento del loro ritiro.

I valori di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi, mentre i valori di $p > 0,05$ sono stati considerati statisticamente non significativi, ma comunque riportati nei grafici. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software statistico SAS (SASPC, versione 9.4, SAS Institute, Cary, NC).

5. RISULTATI

5.1. Caratteristiche Della Popolazione

Dei 126 casi di pazienti registrati nell'archivio con diagnosi di LnH-B, 118 sono risultati eleggibili. La popolazione dello studio comprendeva 92/118 (78%) pazienti di sesso maschile e 26/118 (22%) pazienti di sesso femminile con età media alla diagnosi 9,9 anni e età mediana alla diagnosi 10,2 anni (*range* 2,1-17,8 anni). Il rapporto maschi/femmine è risultato pari a 3,5.

La distribuzione dei casi in base allo stadio di malattia ha identificato 7/118 (5,9%) pazienti in stadio I, 30/118 (25,4%) pazienti in stadio II, 63/118 (53,4%) pazienti in stadio III e 18/118 (15,3%) pazienti in stadio IV. La maggioranza dei pazienti, 81/118 (68,6%), si presentava in stadio avanzato.

La distribuzione dei casi in base al gruppo di rischio ha identificato 3/118 (2,5%) pazienti R1, 37/118 pazienti R2 (31,4%), 23/118 (19,5%) pazienti R3 e 55/118 (46,6%) pazienti R4. Sintomi B erano presenti in 24/118 (20,3%).

Le caratteristiche istologiche e i dati laboratoristici sono riportati nelle Tabelle III e IV.

Caratteristiche		N(%)
Sesso	M	92 (78%)
	F	26 (22%)
Età (Anni)	Media	9,9
	Mediana	10,2
	<5 anni	18 (15,3%)
	5-10 anni	38 (32,2%)
	>10 anni	62 (52,5%)
Diagnosi istologica*	LB	74 (62,7%)
	DLBCL	27 (22,9%)
	PMLBL	3 (2,5%)
	L. follicolare	0
	LnH-B	8 (6,8%)
	inclassificabile	
	LB leucemizzato	6 (5,1%)
Sede anatomica	Addome	56
	Linfonodi	27
	laterocervicali	
	Tonsille	14
	Rinofaringe	8
	Torace-mediastino	16
	Osso	9
	Sottomandibolare	7
	Seno mascellare	3
	Linfonodi inguinali	4
	Testicoli	3
	Sedi multiple	33
Coinvolgimento midollare	Sì	13 (11%)
	No	105 (89%)
Coinvolgimento SNC	Massa	8
	Liquido	1
	cefalorachidiano	
	Combinato	2
Stadio	I	7 (5,9%)
	II	30 (25,4%)
	III	63 (53,4%)
	IV	18 (15,3%)
Gruppo di rischio	R1	3 (2,5%)
	R2	37 (31,4%)
	R3	23 (19,5%)
	R4	55 (46,6%)

Tabella III: Caratteristiche popolazione studiata; *LB: Linfoma di Burkitt; DLBCL: Linfoma diffuso a grandi cellule B; PMLBL (linfoma primitivo mediastinico a grandi cellule B);

Dati laboratoristici		N (%)
LDH (UI/l)	<500	61 (51,7%)
	500-1000	24 (20,3%)
	>1000	33 (28%)
	Mediana	490
IgG alla diagnosi (g/l)	<5,00	9 (7,6%)

Tabella IV: Dati laboratoristici alla diagnosi

*i valori di IgG sono stati analizzati in 49 pazienti perché mancanti nel restante numero di casi

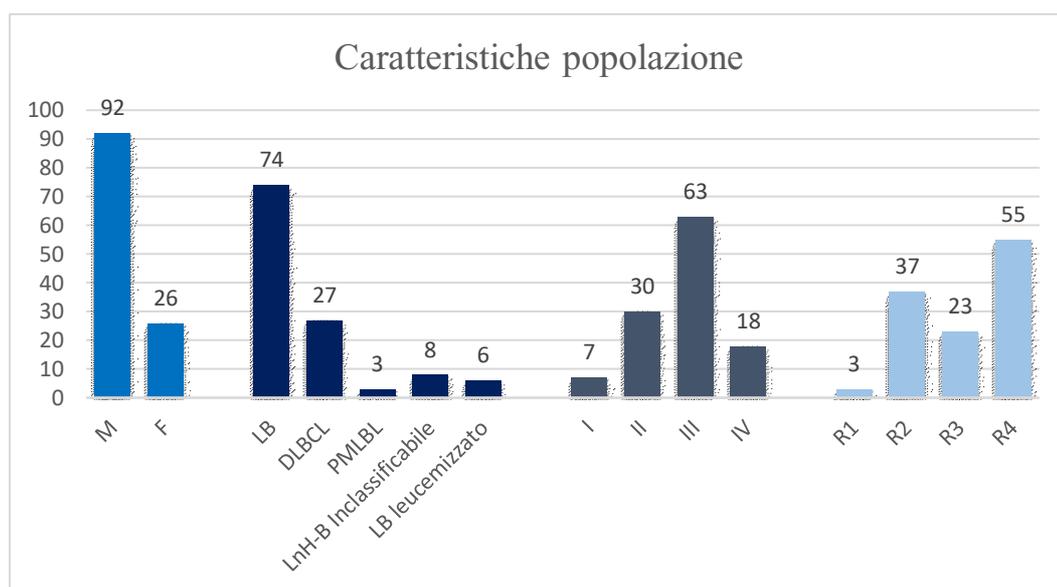


Figura 10: Grafico a barre, caratteristiche popolazione studiata

5.2. Protocollo terapeutico

I 118 pazienti sono stati sottoposti alla seguente terapia:

- AIEOP LNH-97: 65 pazienti
- AIEOP LNH-97 + RITUXIMAB: 53 pazienti.

Dei 65 pazienti trattati con il protocollo AIEOP LNH-97, due hanno ricevuto Rituximab al termine del protocollo stesso, all'interno della seconda linea terapeutica secondo lo schema R-ICE. Quindi in un totale di 55/118 (46,6%) pazienti è stata effettuata la somministrazione di più dosi di Rituximab, mentre 63/118 (53,4%) pazienti hanno effettuato la chemioterapia tradizionale senza Rituximab.

5.3. Caratteristiche dei pazienti nei due gruppi di studio

Caratteristiche		AIEOP LNH-97	AIEOP LNH-97 + Rituximab	<i>p-value</i>
		N(%)	N(%)	
Sesso	M	55 (87,3%)	37 (67,3%)	0,009
	F	8 (12,7%)	18 (32,7%)	
Età (anni)	Media	9,4	10,6	0,14
	Mediana	9,1	10,3	
	<5 anni	11 (17,5%)	7 (12,7%)	0,68
	5-10 anni	21 (33,3%)	17 (30,9%)	
	>10 anni	31 (49,2%)	31 (56,4%)	
Diagnosi istologica*	LB	46 (73%)	29 (52,7%)	0,02
	DLBCL	11 (17,5%)	16 (29%)	
	PMLBL	1 (1,6%)	2 (3,6%)	
	L. follicolare	0	0	
	LnH-B	5 (7,9%)	3 (5,5%)	
	inclassificabile			
	LB leucemizzato	0	5 (9,1%)	
Stadio	I	5 (7,9%)	2 (3,6%)	0,43
	II	18 (28,6%)	12 (21,8%)	
	III	33 (52,4%)	30 (54,5%)	
	IV	7 (11,1%)	11 (20,1%)	
Gruppo di rischio	R1	3 (4,8%)	0	0,002
	R2	24 (38%)	13 (23,6%)	
	R3	16 (25,4%)	7 (12,7%)	
	R4	20 (31,8%)	35 (63,7%)	
LDH (UI/l)	<500	31 (49,2%)	30 (54,5%)	0,33
	500-1000	16 (25,4%)	8 (14,5%)	
	>1000	16 (25,4%)	17 (31%)	0,09
	Mediana	504	377	
Durata media terapia	R2	52,03	73,16	0,15
	R3	64,31	128,84	0,00017
	R4	87,87	109,52	0,05
Valori di IgG alla diagnosi (g/l)	Media	8,6	7,1	0,07

Tabella V: Caratteristiche pazienti nei due gruppi di studio

*LB: Linfoma di Burkitt; DLBCL: Linfoma diffuso a grandi cellule B; PMLBL (linfoma primitivo mediastinico a grandi cellule B);

°i valori di IgG sono stati analizzati in 49 pazienti perché mancanti nel restante numero di casi

La tabella V riporta le caratteristiche dei pazienti separate secondo il protocollo terapeutico.

Si è analizzata la durata media della terapia secondo il gruppo di rischio assegnato nei due campioni.

Secondo il protocollo AIEOP LNH-97¹⁶ ciascun blocco ha una durata di 5 giorni, tra un blocco e il successivo è prevista una pausa di almeno 9 giorni; condizione fondamentale per l'inizio del nuovo ciclo è il riscontro all'emocromo di valori idonei. Rituximab è somministrato il giorno prima dell'inizio di ciascun blocco, mentre per il primo blocco è somministrato durante l'ultimo giorno di prefase.

Teoricamente la durata del protocollo dovrebbe essere, divisa per gruppo di rischio, pari a:

- R2: 52 giorni;
- R3: 66 giorni;
- R4: 80 giorni.

Nel nostro gruppo di studio si sono osservate le seguenti durate:

- Gruppo AIEOP LNH-97 senza Rituximab:
 - o R2: 52,03;
 - o R3: 92,54;
 - o R4: 87,87
- Gruppo AIEOP LNH-97 + Rituximab:
 - o R2: 73,16;
 - o R3: 128,84;
 - o R4: 109,52.

La durata media del gruppo R3 supera quella del gruppo R4 per la minor numerosità campionaria (7 pazienti R3-35 pazienti R4) e perché i pazienti di questo gruppo hanno manifestato importanti effetti collaterali, tra cui perforazione intestinale da ulcera duodenale con necessità di intervento chirurgico, pancreatite acuta ed epatite acuta.

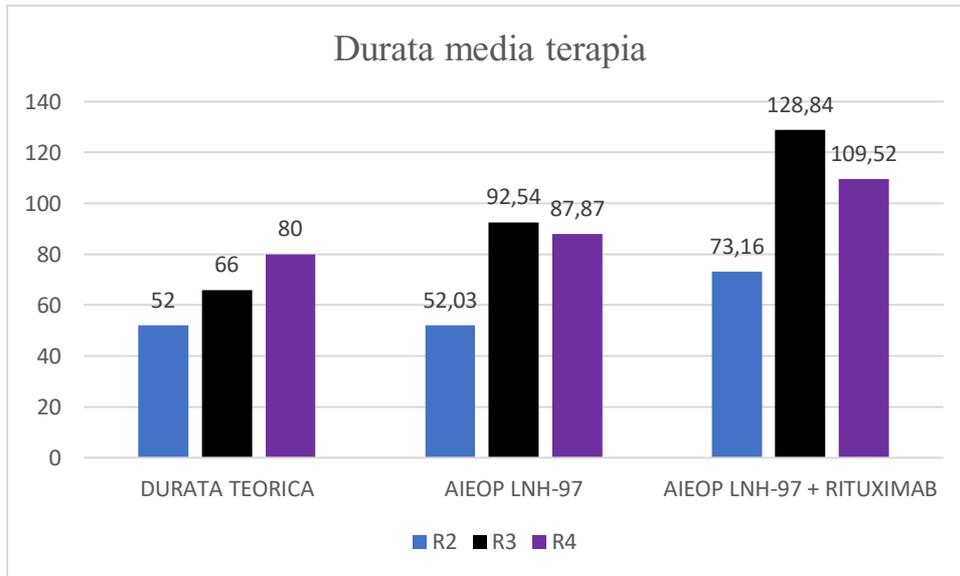


Figura 11: Grafico a barre, durata media della terapia nei pazienti suddivisi secondo il gruppo di rischio

Quattro pazienti del gruppo che ha ricevuto Rituximab sono andati incontro a trapianto di cellule staminali ematopoietiche (TCSE) per persistenza di malattia al termine del ciclo chemioterapico:

- 2 pazienti sono stati sottoposti a TCSE autologo;
- 2 pazienti sono stati sottoposti a TCSE da donatore familiare; a causa di una ulteriore ricaduta un paziente ha ricevuto un secondo TCSE da un secondo familiare.

Un paziente dopo aver ricevuto Rituximab ha sviluppato come effetto collaterale leucoencefalopatia delle regioni posteriori. In un paziente si è sviluppata un'infezione polmonare entrata in diagnosi differenziale con un possibile linfoma secondario di basso grado, motivo per cui è stato sottoposto a biopsia, il cui esito negativo ha confermato l'eziologia infettiva.

Nessun paziente del gruppo AIEOP LNH-97 senza Rituximab è andato incontro a TCSE.

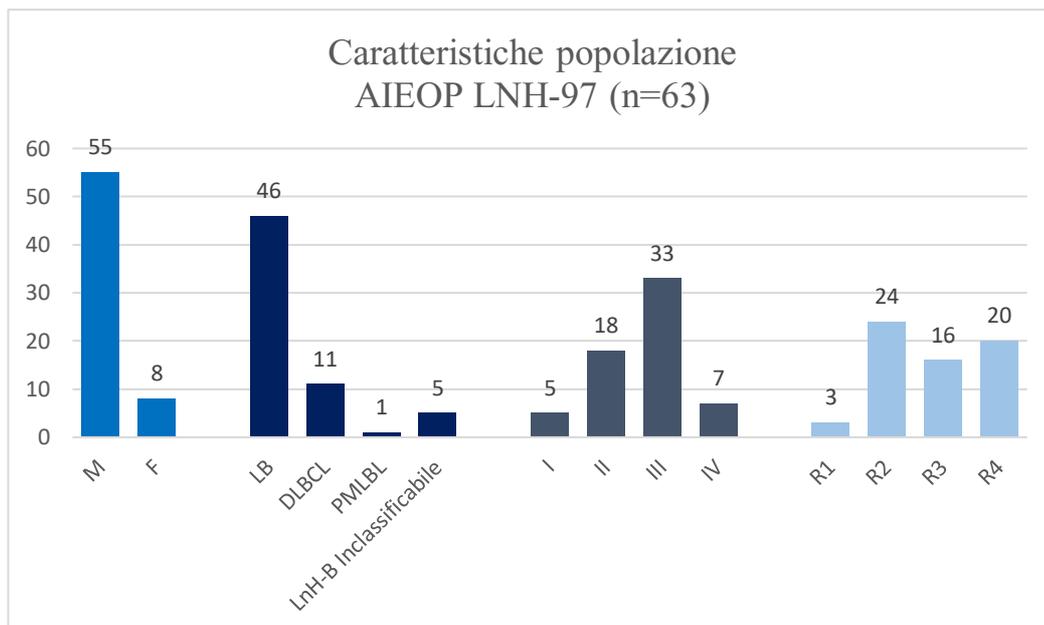


Figura 12: Grafico a barre, caratteristiche popolazione AIEOP LNH-97

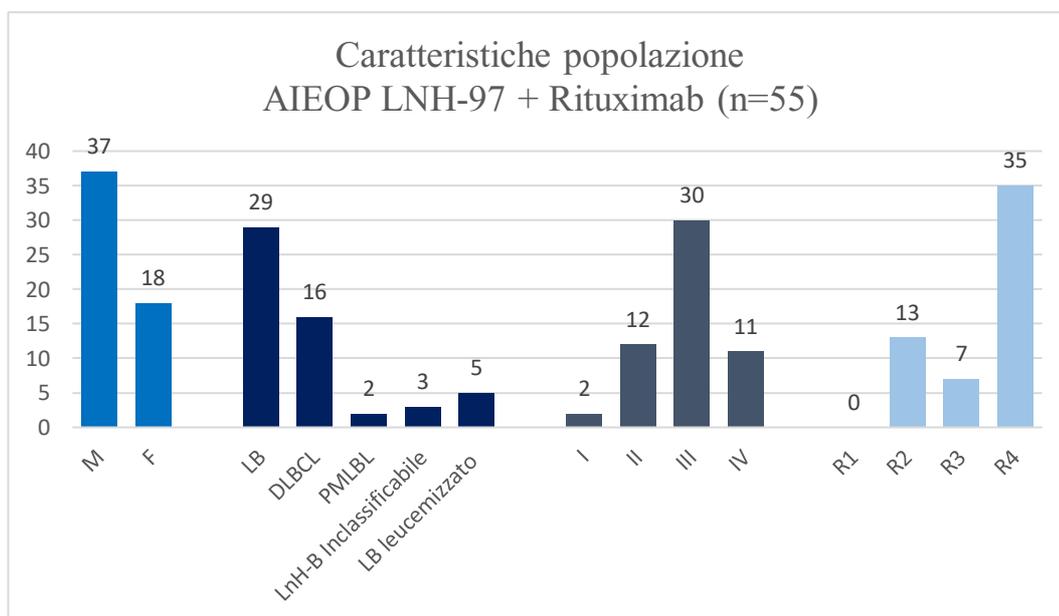


Figura 13: Grafico a barre, caratteristiche popolazione AIEOP LNH-97 + Rituximab

5.4. Follow up valori di immunoglobuline nel gruppo AIEOP LNH-97 + Rituximab ed eventi infettivi

	Evento infettivo SI	Evento infettivo NO	TOTALE
IgG (g/l) al termine della terapia <5,00	14	13	27
>5,00	8	20	28
Totale	22	33	55

Tabella VI: Correlazione valori IgG ed evento infettivo

I pazienti trattati secondo protocollo AIEOP LNH-97 + Rituximab sono stati sottoposti a monitoraggio del valore di IgG, in particolare si è analizzato il valore al termine della terapia e a distanza di uno e due anni, con stretto *follow-up* in caso di riscontro di deficit, definito dal valore di IgG <5,00 g/l. In caso di riscontro in più misurazioni successive di valori di IgG fisiologici si è interrotta la misurazione.

Dei 9 pazienti che sono risultati carenti già prima dell'inizio della terapia 7 sono stati trattati con Rituximab: in tutti si è registrata la persistenza di valori di IgG a un anno dallo stop terapia <5,00 g/l. Di questi pazienti, 6/7 hanno ricevuto la supplementazione, colui che non ha ricevuto Ig endovena aveva un valore di IgG stabile nel tempo pari a 4,67 g/l.

I dati sono stati analizzati mediante il test del X^2 che ha dimostrato l'assenza di correlazione tra il valore di IgG e il verificarsi di episodi infettivi ($p\text{-value}=0,09$).

Si è analizzata la necessità di supplementare Ig endovena nei pazienti risultati carenti, in particolare:

- durante/alla fine della terapia 30 pazienti hanno richiesto la supplementazione;
- a un anno dallo stop della terapia 25 pazienti hanno richiesto la supplementazione per valori di IgG ancora <5,00 g/l;
- a due anni dallo stop della terapia 10 pazienti hanno richiesto la supplementazione per valori di IgG <5,00 g/l.

Gli episodi infettivi si sono verificati in tutti i pazienti in corso di terapia o subito al termine del protocollo, i principali agenti responsabili identificati sono stati:

- Batteri:
 - o Escherichia Coli: Bacillo capsulato, Gram -, anaerobio facoltativo;

- *Pseudomonas Aeruginosa*: Bacillo capsulato, Gram-, aerobio obbligato;
 - *Neisseria*: Diplococco capsulato, Gram -, aerobio;
 - *Enterococcus faecalis*: Cocco non capsulato, Gram+, anaerobio facoltativo;
 - *Clostridium difficile*: bastoncello non capsulato, Gram+, anaerobio;
 - *Stafilococco Aureus*: cocco non capsulato, Gram+, aerobio/anaerobio facoltativo;
 - *Moraxella Catarrhalis*: diplococco non capsulato, Gram-, aerobio obbligato,
- Virus:
- RSV: famiglia Paramyxoviridae, virus a RNA a singolo filamento;
 - HSV: famiglia Herpesviridae, virus a DNA lineare a doppio filamento;
 - EBV: famiglia Herpesviridae, virus a DNA lineare a doppio filamento;
 - Parvovirus B19: famiglia Parvoviridae, virus a DNA a singolo filamento;
 - Norovirus: famiglia Caliciviridae, virus a RNA a singolo filamento.

Al contrario, nonostante i valori a uno e due anni di IgG inferiori rispetto al *cut-off* e per i quali tutti i pazienti sono stati sottoposti periodicamente a supplementazione endovena, non si sono registrati eventi infettivi maggiori tali da richiedere trasferimento in terapia intensiva.

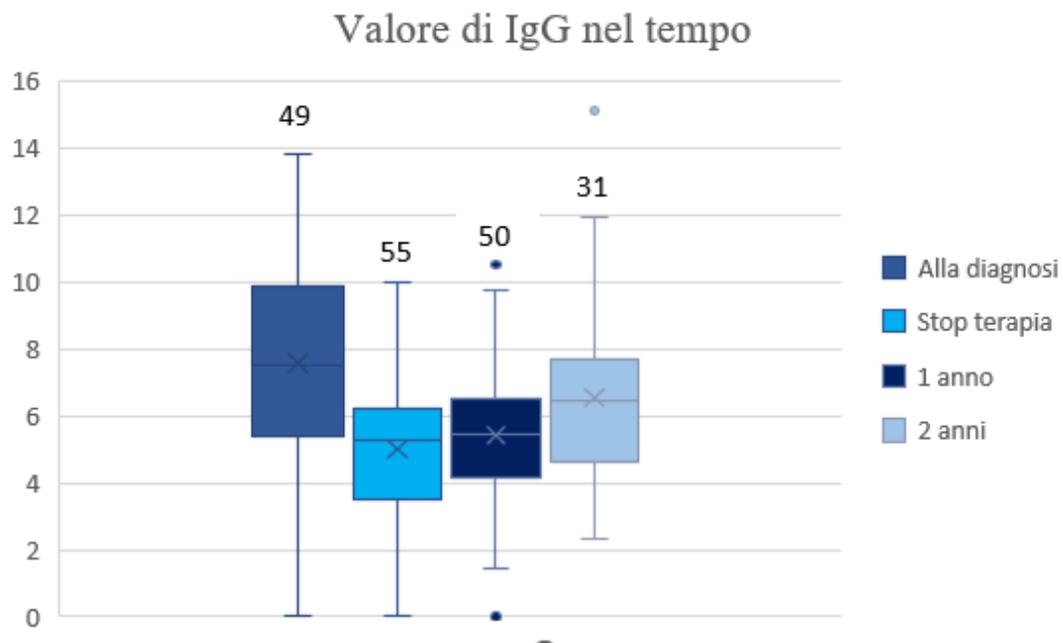


Figura 14: Diagramma a scatola e baffi, valore IgG nel tempo

5.5. Caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione durante/al termine della terapia

Caratteristiche		N(%)
Sesso	M	23 (76,7%)
	F	7 (23,3%)
Età (Anni)	Media	9,1
	Mediana	8,8
	<5 anni	7 (23,3%)
	5-10 anni	11 (36,7%)
	>10 anni	12 (40%)
Diagnosi istologica*	LB	17 (56,6%)
	DLBCL	5 (16,7%)
	PMLBL	0
	L. follicolare	0
	LnH-B inclassificabile	3 (10%)
	LB leucemizzato	5 (16,7%)
Stadio	I	0
	II	6 (20,1%)
	III	17 (56,6%)
	IV	7 (23,3%)
Gruppo di rischio	R1	0
	R2	4 (13,3%)
	R3	2 (6,7%)
	R4	24 (80%)

Tabella VII: Caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione durante/al termine della terapia

***LB: Linfoma di Burkitt; DLBCL: Linfoma diffuso a grandi cellule B; PMLBL (linfoma primitivo del mediastinico a cellule B)**

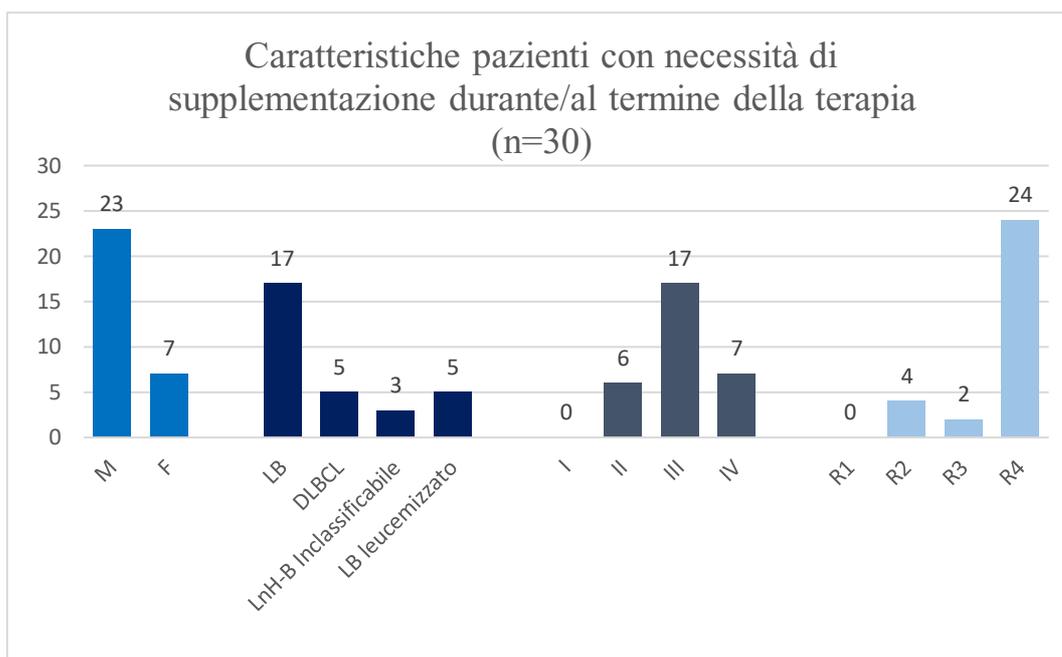


Figura 15: Grafico a barre, caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione durante/al termine della terapia

Analizzando i dati dei 30 pazienti che hanno richiesto la supplementazione durante/al termine della terapia si nota come la maggior parte (24/30; 80%) appartenesse a un gruppo di rischio alla diagnosi R4, gruppo per il quale il protocollo terapeutico prevede la somministrazione di 6 dosi di Rituximab. Alcuni pazienti di questo gruppo hanno ricevuto dosi aggiuntive come conseguenza della necessità di sottoporsi a secondo protocollo terapeutico secondo lo schema R-ICE o per scelta del centro a seguito della visione delle immagini radiografiche post terapia.

I 30 pazienti compresi in questo gruppo hanno ricevuto il seguente numero di dosi:

- 14 pazienti: 6 dosi;
- 4 pazienti: 7 dosi;
- 6 pazienti: 4 dosi;
- 2 pazienti: 5 dosi
- 1 paziente: 2 dosi;
- 1 paziente: 8 dosi;
- 1 paziente: 9 dosi;
- 1 paziente: 14 dosi;

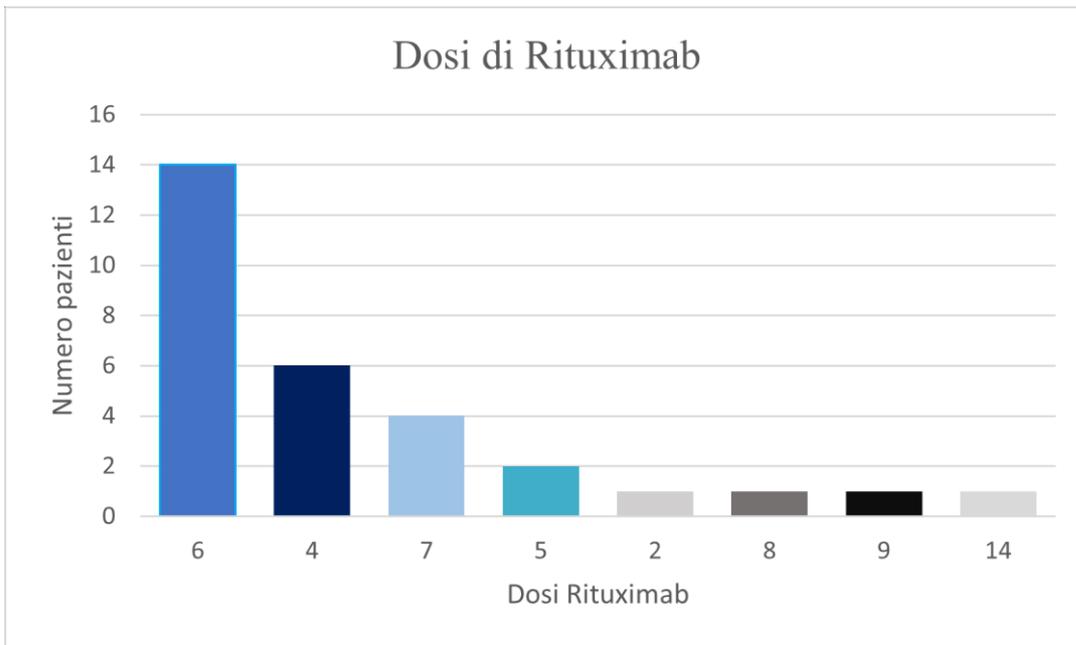


Figura 16: Grafico a barre, dosi di rituximab in pazienti con necessità di supplementazione durante/alla fine della terapia

5.6. Caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione a un anno

Caratteristiche		N(%)
Sesso	M	19 (76%)
	F	6 (24%)
Età (Anni)	Media	9,9
	Mediana	10,2
	<5 anni	7 (28%)
	5-10 anni	9 (36%)
	>10 anni	9 (36%)
Diagnosi istologica*	LB	14 (56%)
	DLBCL	4 (16%)
	PMLBL	0
	L. follicolare	0
	LnH-B inclassificabile	2 (8%)
	LB leucemizzato	5 (20%)
Stadio	I	0
	II	4 (16%)
	III	16 (64%)
	IV	5 (20%)
Gruppo di rischio	R1	0
	R2	2 (8%)
	R3	2 (8%)
	R4	21 (84%)

Tabella VIII: Caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione a un anno

*LB: Linfoma di Burkitt; DLBCL: Linfoma diffuso a grandi cellule B; PMLBL (linfoma primitivo del mediastico a cellule B)

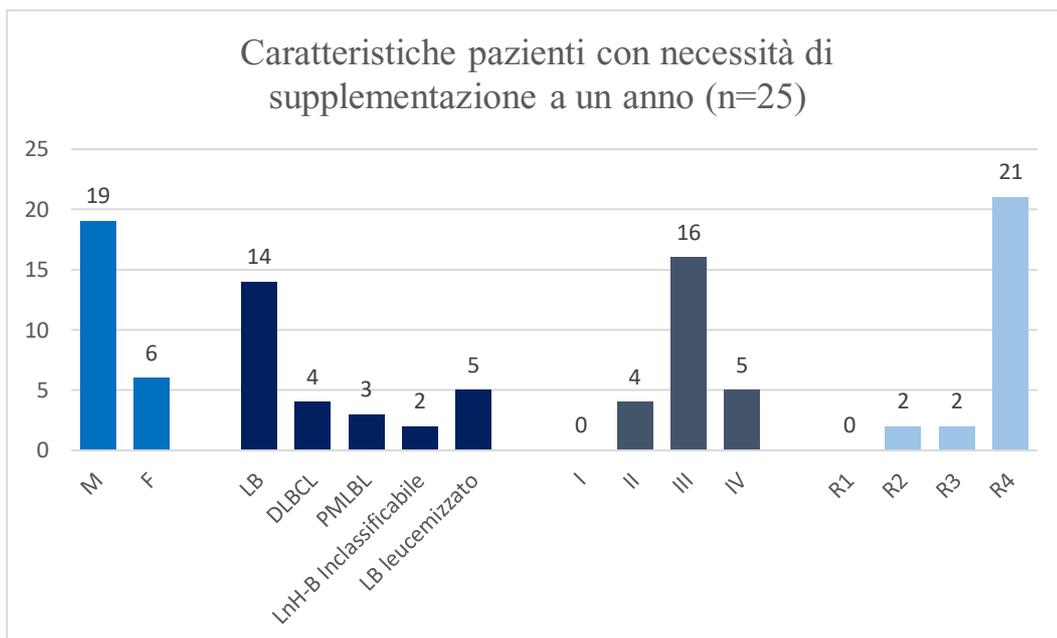


Figura 17: Grafico a barre, caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione a un anno

I 25 pazienti compresi in questo gruppo hanno ricevuto il seguente numero di dosi:

- 14 pazienti: 6 dosi;
- 4 pazienti: 7 dosi;
- 3 pazienti: 4 dosi;
- 1 paziente: 2 dosi;
- 1 paziente: 8 dosi;
- 1 paziente: 9 dosi;
- 1 paziente: 14 dosi;

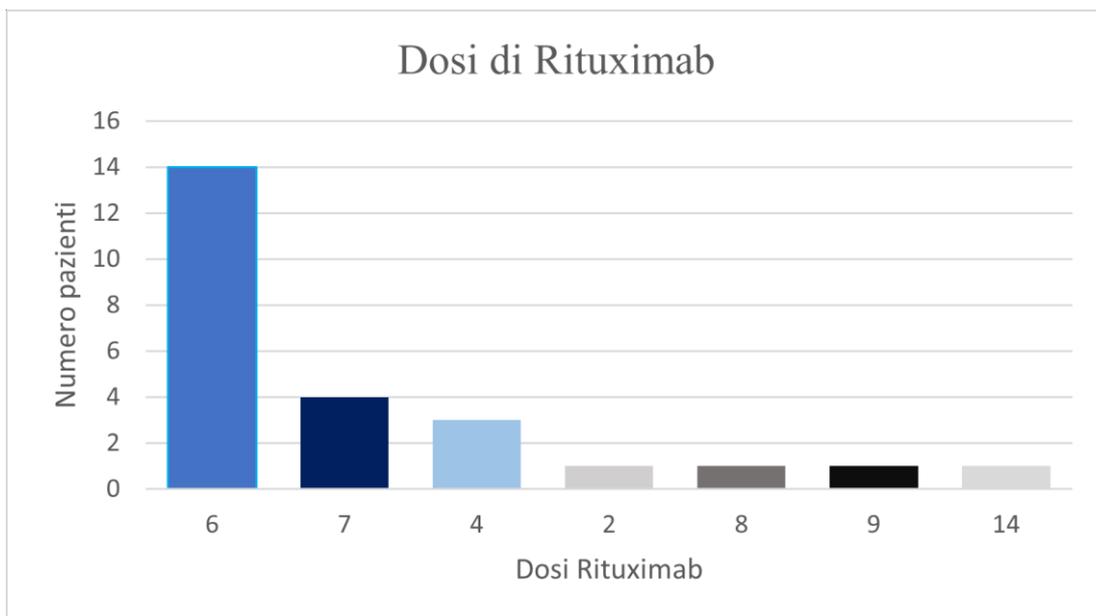


Figura 18: Grafico a barre, dosi rituximab in pazienti con necessità di supplementazione a un anno

5.7. Caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione a due anni

Caratteristiche		N(%)
Sesso	M	8 (80%)
	F	2 (20%)
Età (Anni)	Media	9,2
	Mediana	8,7
	<5 anni	1 (10%)
	5-10 anni	5 (50%)
	>10 anni	4 (40%)
Diagnosi istologica*	LB	6 (60%)
	DLBCL	1 (10%)
	PMLBL	0
	L. follicolare	0
	LnH-B inclassificabile	1(10%)
	LB leucemizzato	2 (20%)
Stadio	I	0
	II	1 (10%)
	III	7 (70%)
	IV	2 (20%)
Gruppo di rischio	R1	0
	R2	0
	R3	1 (10%)
	R4	9 (90%)

Tabella IX: Caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione a due anni; *LB: Linfoma di Burkitt; DLBCL: Linfoma diffuso a grandi cellule B; PMLBL (linfoma primitivo del mediastico a cellule B)

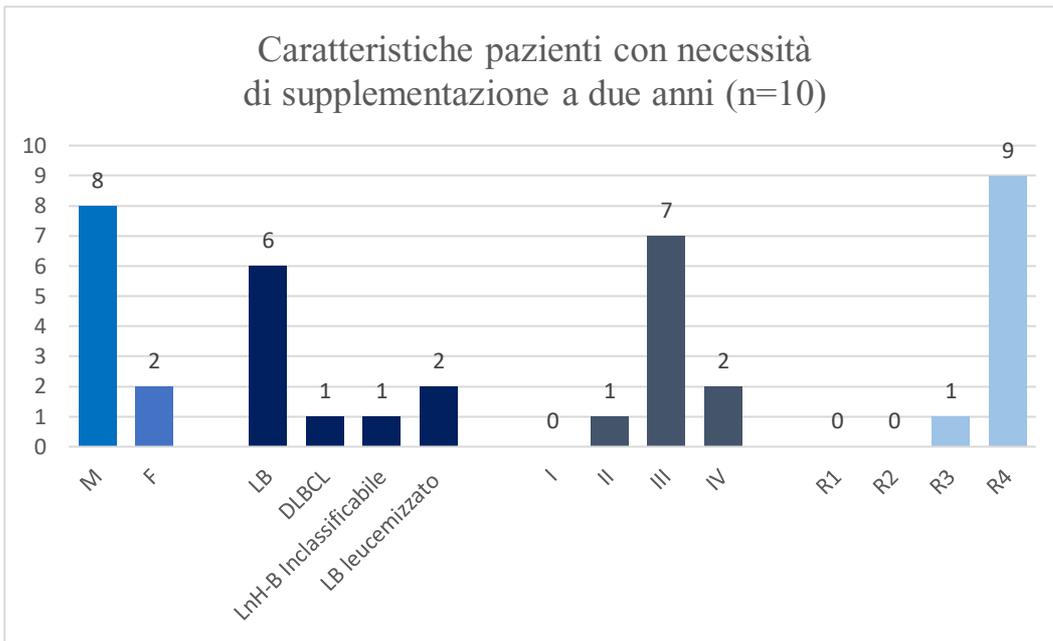


Figura 19: Grafico a barre, caratteristiche pazienti con necessità di supplementazione a due anni

I 10 pazienti compresi in questo gruppo hanno ricevuto il seguente numero di dosi:

- 7 pazienti: 6 dosi;
- 1 pazienti: 8 dosi;
- 1 paziente: 4 dosi;
- 1 paziente: 7 dosi;

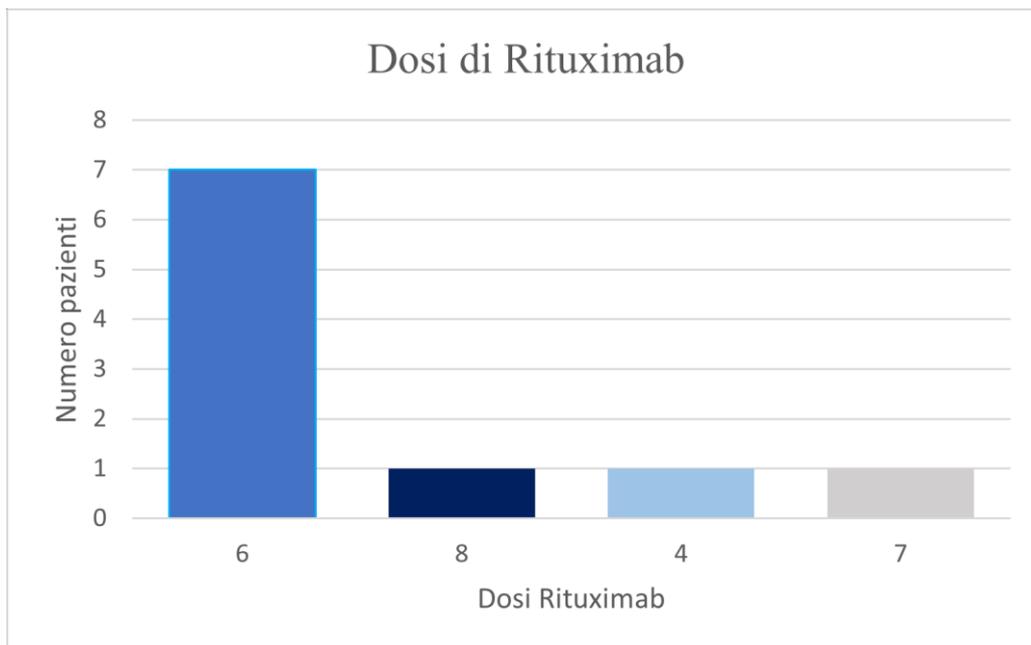


Figura 20: Grafico a barre, dosi Rituximab in pazienti con necessità di supplementazione a due anni

5.8. Analisi RFS

Nei 118 pazienti analizzati si sono registrati eventi in 4 casi, tutti entro i 5 anni dalla diagnosi: 3 ricadute e 1 malattia refrattaria. Tutti e 4 i pazienti erano stati trattati secondo il protocollo AIEOP LNH-97 + Rituximab ed erano assegnati al gruppo di rischio R4.

La RFS globale a 6 anni per i 118 pazienti è risultata pari a 96% (ES \pm 2%).

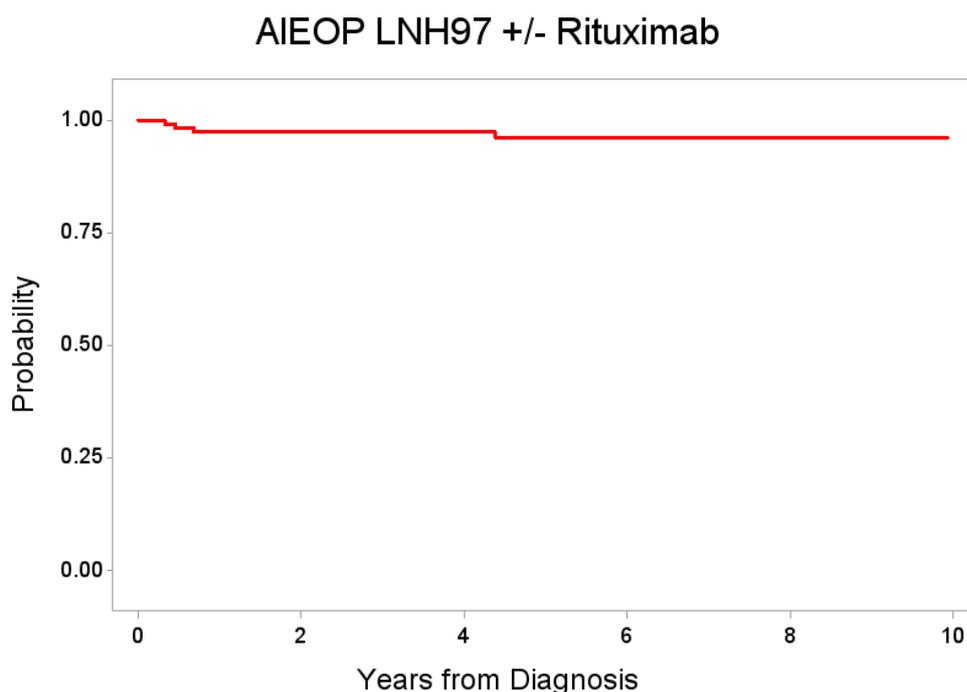


Figura 21: RFS globale (96%)

La RFS a 6 anni non varia significativamente stratificando i pazienti in base al gruppo di rischio assegnato e in base alle infezioni: per R1, R2 e R3 RFS a 6 anni = 100%, con 0 eventi, e per il R4 RFS a 6 anni = 92% (ES \pm 4%), con 4 eventi; *p-value* = 0,18 non statisticamente significativo. Per i pazienti che hanno avuto infezioni RFS a 6 anni = 100%, con 0 eventi, e per i pazienti che non hanno avuto infezioni RFS a 6 anni = 95% (ES \pm 3%), con 4 eventi; *p-value* = 0,22 non statisticamente significativo.

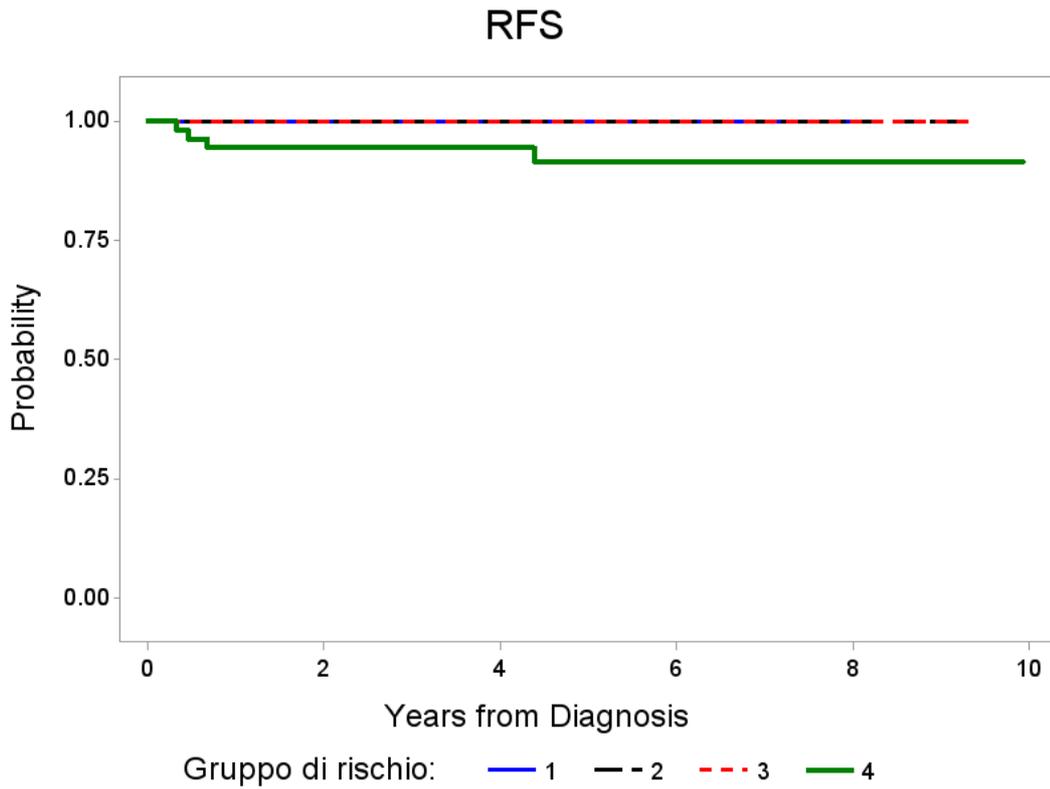


Figura 23: RFS stratificando i pazienti in base alle infezioni, p-value=0,18, non statisticamente significativo

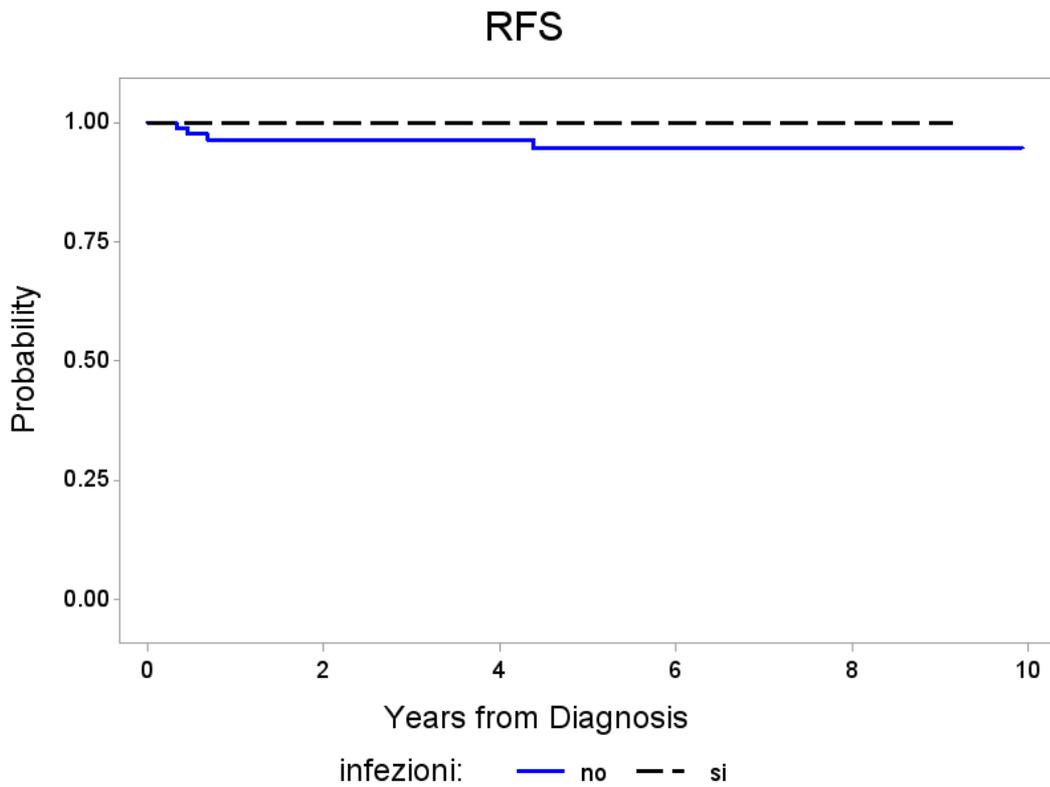


Figura 22: RFS stratificando i pazienti secondo il gruppo di rischio, p-value=0,22, non statisticamente significativo

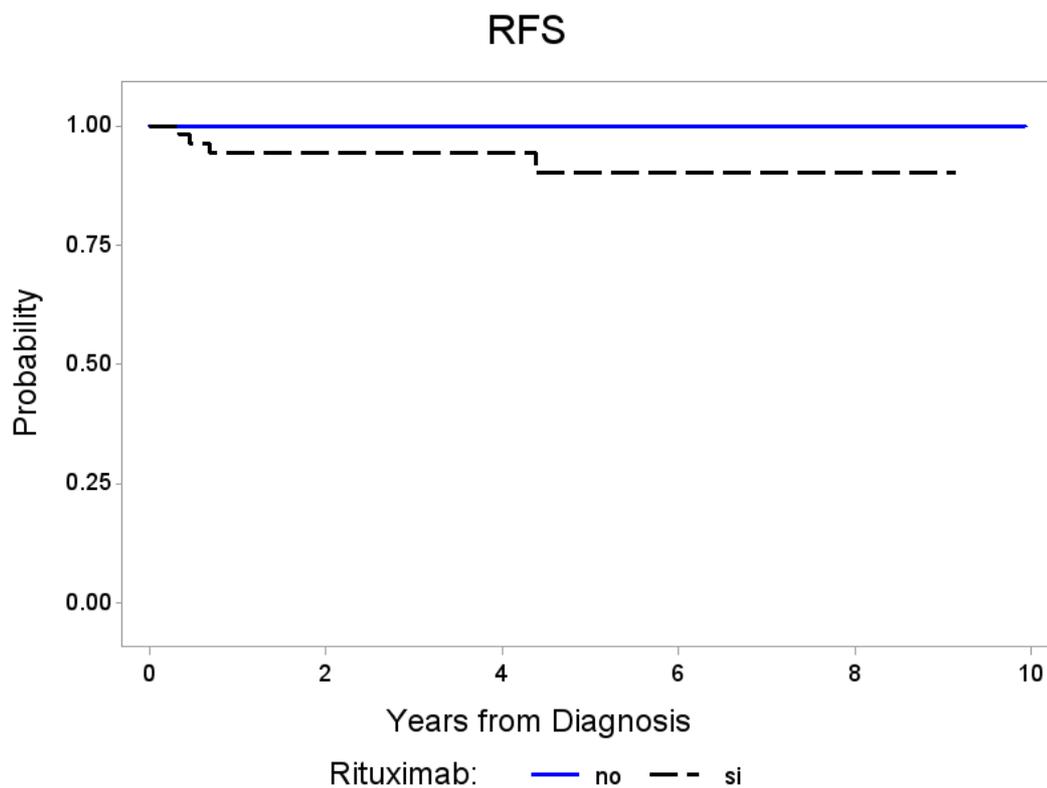


Figura 24: RFS stratificando i pazienti in base all'aggiunta o meno di Rituximab, p -value=0,0158, statisticamente significativo

La RFS a 6 anni varia significativamente stratificando i pazienti in base all'aggiunta o meno del Rituximab al protocollo chemioterapico standard: per i pazienti che non hanno ricevuto Rituximab RFS a 6 anni = 100%, con 0 eventi, e per i pazienti che hanno ricevuto Rituximab RFS a 6 anni = 90% (ES \pm 5%), con 4 eventi; p -value = 0,0158 statisticamente significativo.

6. DISCUSSIONE

L'aggiunta di Rituximab alla chemioterapia ad alta dose intensità ha permesso di migliorare in modo significativo la sopravvivenza dei bambini e adolescenti affetti da LnH-B¹⁷. Pochi dati sono riportati in letteratura²⁹ sugli effetti a breve e lungo termine nella popolazione pediatrica, con particolare riferimento all'ipogammaglobulinemia secondaria e alle complicanze infettive ad essa connesse. In questo studio è stato descritto l'impatto dell'aggiunta del Rituximab sulla ricostituzione immunologica dopo la terapia e nel periodo di follow up in una popolazione trattata nel protocollo AIEOP LNH-97 con e senza l'aggiunta del Rituximab. Il rituximab, infatti, causa la deplezione di cellule CD-20 positive, precursori di plasmacellule secernenti anticorpi¹⁹, ma non è noto se questo effetto sia temporaneo o permanente. Abbiamo pertanto condotto uno studio retrospettivo comparativo che ha permesso di valutare gli effetti a breve e a lungo termine del Rituximab aggiunto alla terapia standard e di valutare l'incidenza di infezioni nei due gruppi.

Le caratteristiche epidemiologiche della popolazione oggetto di studio sono risultate conformi a quanto riportato in letteratura³⁰ con un'età mediana alla diagnosi di 10,2 anni (*range* 2,1-17,8 anni) e una maggior prevalenza del sesso maschile, rapporto M:F=3,5.

Nella maggior parte dei pazienti la diagnosi istologica è stata di LB (62,7%), anche in forma leucemizzata (5,1%), e di DLBCL (22,9%); solo in una minoranza dei casi sono stati diagnosticati PMLBL (2,5%) o forme di LnH-B inclassificati (6,8%).

Coerentemente con quanto riportato in letteratura³⁰ la maggior parte delle forme diagnostiche aveva sede a livello addominale (56 casi), in particolare intestinale, o a carico dei linfonodi laterocervicali (27 casi). In 33 pazienti le sedi interessate erano multiple. Nell'11% dei pazienti alla diagnosi era presente coinvolgimento midollare e nel 7% coinvolgimento del SNC.

Lo studio della distribuzione secondo lo stadio di malattia e il gruppo di rischio ha documentato una prevalenza di casi diagnosticati in stadio III (53,4%) e gruppo di rischio R4 (46,6%).

I 118 pazienti arruolati sono stati trattati secondo il protocollo AIEOP LNH-97 con o senza l'aggiunta di Rituximab. In particolare, 63 pazienti non hanno ricevuto

Rituximab mentre 55 pazienti lo hanno ricevuto. Si è osservata una differenza statisticamente significativa confrontando i due gruppi e stratificandoli secondo sesso e tipo di diagnosi istologica (*p-value* rispettivamente 0,009 e 0,02), associazione probabilmente casuale.

L'età mediana dei pazienti del gruppo che non ha ricevuto Rituximab era pari a 9,1, mentre nel gruppo in cui è stato somministrato Rituximab era pari a 10,3.

Per quanto riguarda la distribuzione nei due gruppi secondo il gruppo di rischio si nota una maggior rappresentazione della classe di rischio R4 (63,7%) nel gruppo che ha ricevuto Rituximab con una differenza statisticamente significativa (*p-value*=0,002), in linea con quanto riportato in letteratura che autorizza e suggerisce l'utilizzo di Rituximab in pazienti con malattia di alto grado.¹⁷

Secondo il protocollo AIEOP LNH-97¹⁶ ciascun blocco ha una durata di 5 giorni, tra un blocco e il successivo è prevista una pausa di almeno 9 giorni; condizione fondamentale per l'inizio del nuovo ciclo è il riscontro all'emocromo di valori idonei. Rituximab è somministrato il giorno prima dell'inizio di ciascun blocco, mentre per il primo blocco è somministrato durante l'ultimo giorno di prefase.

Teoricamente la durata del protocollo dovrebbe essere, divisa per gruppo di rischio, come segue: per il gruppo R2 pari a 52 giorni, per il gruppo R3 pari a 66 giorni e per il gruppo R4 pari a 80 giorni.

In entrambi i gruppi analizzati nel nostro studio la durata media della terapia è risultata maggiore rispetto ai tempi standard definiti nel protocollo. In particolar modo, stratificando i pazienti secondo la durata della terapia nei diversi gruppi di rischio, si è dimostrata una differenza statisticamente significativa nei gruppi R3 e R4 che hanno ricevuto Rituximab (*p-value* rispettivamente 0,00017 e 0,05), a testimoniare una più intensa tossicità e conseguentemente un allungamento dei tempi di ripresa ematologica rispetto al gruppo di pazienti che non ha ricevuto Rituximab.

In letteratura è presente uno studio retrospettivo di coorte²⁸ che ha indagato l'insorgenza di ipogammaglobulinemia secondaria alla terapia con Rituximab in pazienti adulti con varie patologie, non esclusivamente neoplastiche. Secondo questo studio il 47,8% dei pazienti nei quali erano stati dosati i valori di Ig prima dell'inizio della terapia ha sviluppato successivamente ipogammaglobulinemia. Nei pazienti che invece già presentavano il deficit si è osservato un peggioramento

dei livelli di Ig. Anche nel paziente pediatrico sono stati ottenuti simili risultati: nel 42,6% dei pazienti si è riscontrato un peggioramento dei livelli di IgG post terapia con Rituximab. I dati relativi al nostro centro dimostrano un peggioramento dei livelli di IgG nel 42,3% dei pazienti a cui è stato somministrato Rituximab.

È noto che le IPD^{31, 8, 9} sono un fattore di rischio per lo sviluppo di linfomi nei bambini, anche se spesso il riscontro dello stato di immunodeficienza è successivo alla diagnosi del linfoma stesso.

Il sospetto è alto soprattutto in pazienti con livelli di Ig ridotti già al momento della diagnosi e nei quali il quadro è rimasto invariato anche successivamente. Per alcuni pazienti parte del nostro studio è stata richiesta l'analisi genetica volta a ricercare eventuali mutazioni causa di IDP che potrebbero giustificare, oltre che l'origine della neoplasia, anche il quadro di deficit di Ig. Per tale motivo quindi nel nostro centro è attualmente in corso uno studio che ha l'obiettivo di approfondire il possibile legame tra condizioni di IDP, sviluppo di neoplasie e persistenza di quadri di ipogammaglobulinemia dopo la terapia. I dati di questo studio saranno disponibili in futuro.

Per il nostro studio si è scelto come valore soglia per definire l'ipogammaglobulinemia il riscontro di IgG < 5,00 g/l. Alla diagnosi il dosaggio di IgG è stato effettuato in 49/118 pazienti con il riscontro di valori < 5,00 g/l in 9 pazienti (7,63%), di cui 7 (12,7%) trattati con Rituximab. Dal confronto con la letteratura, in cui è riportata un'incidenza di ipogammaglobulinemia pari al 28,7%, nel nostro gruppo di studio il dato è più basso. Questo può essere legato al fatto che lo studio pubblicato fa riferimento a una numerosità campionaria maggiore e a pazienti con patologie non solo neoplastiche, ma anche reumatologiche, per cui già in trattamento con farmaci immunosoppressivi prima dell'inizio di Rituximab.

I valori di IgG nel tempo, allo stop terapia e a distanza di uno e due anni dal termine del protocollo, sono stati dosati nei pazienti assegnati al gruppo che ha ricevuto Rituximab.

In letteratura²⁹ non sono riportate linee guida con indicazioni precise circa la necessità di supplementare Ig per via endovenosa in pazienti pediatrici con diagnosi di neoplasia; il valore soglia è definito dal singolo centro. Nel nostro caso per definire la necessità di supplementazione endovenosa di Ig è stato mantenuto il valore soglia, ossia pari a 5,00 g/L.

In 30/55 (55%) si è resa necessaria la supplementazione di Ig endovena per aver riscontrato livelli di IgG < 5,00 g/l durante/al termine della terapia, in 25 pazienti la supplementazione è stata fatta anche a distanza di un anno ed in 10 anche a distanza di due anni. Nei pazienti con valori di IgG ripetutamente sopra il *cut-off* si è interrotta la misurazione.

Sono stati analizzati i dati dei pazienti che hanno avuto necessità di ricevere Ig endovena nel tempo: nel gruppo di 30 pazienti con necessità di supplementazione durante/al termine della terapia si è notata una prevalenza di diagnosi allo stadio III (17/30; 56,6%) e gruppo di rischio R4 (24/30; 80%); nel gruppo di 25 pazienti con necessità di supplementazione a un anno dalla diagnosi si è notata una prevalenza di diagnosi allo stadio III (16/25; 64%) e gruppo di rischio R4 (21/25; 84%); nel gruppo di 10 pazienti con necessità di supplementazione a due anni dalla diagnosi si è notata una prevalenza di diagnosi allo stadio III (7/10; 70%) e gruppo di rischio R4 (9/10; 90%). È possibile dedurre quindi che potrebbe esserci una correlazione tra il numero di dosi di Rituximab e lo sviluppo di ipogammaglobulinemia, essendo che la terapia per il gruppo di rischio R4 prevede la somministrazione di almeno 6 dosi di Rituximab.

L'ipogammaglobulinemia è associata a un aumentato rischio infettivo³²: in particolare si è riscontrato aumento di infezioni batteriche e, in una minoranza dei casi, virali. I principali organismi identificati sono stati: Haemophilus influenzae, Pseudomonas Aeruginosa, Stafilococco aureus, HSV, EBV.

Nel nostro studio 22 pazienti su 55 che hanno ricevuto Rituximab hanno sviluppato un evento infettivo e in 14 di questi il valore di IgG era < 5,00 g/l.

Gli agenti patogeni principalmente rilevati nella nostra popolazione sono risultati conformi a quanto riportato in letteratura.

L'analisi di RFS globale nel nostro gruppo di studio è risultata pari a 96%. Inoltre, la RFS non varia significativamente stratificando i pazienti secondo il gruppo di rischio e il manifestarsi o meno di eventi infettivi. Nonostante tra le possibili conseguenze dell'ipogammaglobulinemia correlata a rituximab sia riportato il rischio di sviluppare secondo tumore, in nessuno dei nostri pazienti analizzati si è riscontrato lo sviluppo di una seconda neoplasia, considerando un tempo mediano di *follow up* di 6,3 anni (*range* 0,6-21,3).

Abbiamo osservato una variazione statisticamente significativa stratificando i pazienti in base al fatto che abbiano o meno ricevuto Rituximab (*p-value*=0,0158).

Questo risultato può essere giustificato considerando la numerosità campionaria e la selezione dei pazienti, essendo questo uno studio retrospettivo per il quale un fondamentale criterio di inclusione era un tempo minimo di follow-up: ciò ha portato all'esclusione dei pazienti deceduti.

Nonostante i limiti legati alla retrospettività dello studio, la nostra analisi ha permesso di osservare come nei pazienti pediatrici con diagnosi di linfoma l'aggiunta di rituximab ha un impatto sulla funzione immunitaria, potendo determinare una prolungata ipogammaglobulinemia. Abbiamo inoltre osservato come anche in pazienti con deficit persistente dei valori di IgG a distanza dal termine della terapia non si sono verificati episodi infettivi maggiori tali da richiedere ricoveri in terapia intensiva. Questo dato permette di sottolineare l'importanza del monitoraggio seriato dei valori di IgG con conseguente supplementazione endovenosa, come strumento fondamentale per garantire il mantenimento di uno stato di salute libero da eventi infettivi.

Il nostro studio, inserito in un contesto di letteratura in cui le informazioni circa gli effetti collaterali del Rituximab nel paziente pediatrico con diagnosi di LNH-B sono ancora poche, mira a contribuire alla conoscenza di tali effetti collaterali, così come è stato fatto nello studio internazionale prospettico Inter B-NHL Ritux 2010³³ i cui risultati saranno pubblicati a breve.

7. CONCLUSIONE

I LnH-B sono delle neoplasie frequenti dell'età pediatrico-adolescenziale spesso diagnosticati in stadio avanzato.

La maggior parte dei pazienti alla diagnosi è assegnata a gruppi di rischio R3, R4 e conseguentemente il trattamento è intensivo e prevede l'aggiunta di Rituximab, secondo quanto riportato in letteratura.

L'aggiunta di rituximab negli ultimi anni ha permesso di migliorare la sopravvivenza, incrementando però gli effetti collaterali, come testimoniato da un allungamento dei tempi medi di durata dalla terapia.

Un importante effetto collaterale a cui prestare attenzione è l'ipogammaglobulinemia post Rituximab, condizione che può determinare l'insorgenza di episodi infettivi maggiori se non identificata. Il monitoraggio periodico dei valori di IgG in pazienti che hanno ricevuto Rituximab è fondamentale per riscontrare eventuali deficit di IgG e per iniziare la terapia di supplementazione endovenosa.

Lo studio condotto dal nostro centro ha permesso di dimostrare come in pazienti con deficit di immunoglobuline durante/al termine della terapia e nei quali si era verificato un evento infettivo il *follow-up* seriato e la supplementazione periodica hanno permesso il non verificarsi di ulteriori episodi infettivi.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Gross TG, Termuhlen AM. Pediatric Non-Hodgkin Lymphoma. Published online 2008.
2. Kim El-Mallawany N, Cairo MS. *Advances in the Diagnosis and Treatment of Childhood and Adolescent B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma*. Vol 13.; 2015
3. Ohn J, Andlund TS, Ames J, Owning RD, Rist MC. *NON-HODGKIN'S LYMPHOMA IN CHILDHOOD*. Massachusetts Medical Society; 1996.
4. Schwartz RS, Lenz G, Staudt LM. *Mechanisms of Disease Aggressive Lymphomas*. Vol 362.; 2010.
5. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, et al. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nature Genetics*. 2008;40(1):108-112. doi:10.1038/ng.2007.35
6. Dominguez-Sola D, Victora GD, Ying CY, et al. The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nature Immunology*. 2012;13(11):1083-1091. doi:10.1038/ni.2428
7. Worch J, Rohde M, Burkhardt B. Mature B-cell lymphoma and leukemia in children and adolescents-review of standard chemotherapy regimen and perspectives. *Pediatric Hematology and Oncology*. 2013;30(6):465-483. doi:10.3109/08880018.2013.783891
8. Conti F. Review Review Rivista di IMMUNOLOGIA e ALLERGOLOGIA PEDIATRICA. doi:10.53151/2531-3916/2022-2
9. Attarbaschi A, Carraro E, Abla O, et al. Non-Hodgkin lymphoma and pre-existing conditions: Spectrum, clinical characteristics and outcome in 213 children and adolescents. *Haematologica*. 2016;101(12):1581-1591. doi:10.3324/haematol.2016.147116
10. Worch J, Rohde M, Burkhardt B. Mature B-cell lymphoma and leukemia in children and adolescents-review of standard chemotherapy regimen and perspectives. *Pediatric Hematology and Oncology*. 2013;30(6):465-483. doi:10.3109/08880018.2013.783891
11. Ohn J, Andlund TS, Ames J, Owning RD, Rist MC. *Non Hodgkins Lymphoma in Children*. Massachusetts Medical Society; 1996.
12. Huang MS, Weinstein HJ. Non-Hodgkin lymphoma. In: *Lanzkowsky's Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. Elsevier; 2022:473-483. doi:10.1016/B978-0-12-821671-2.00040-4

13. Mussolin L, Damm-Welk C, Pillon M, Woessmann W. cancers Minimal Disease Monitoring in Pediatric Non-Hodgkin's Lymphoma: Current Clinical Application and Future Challenges. Published online 2021. doi:10.3390/cancers13081907
14. Murphy SB. Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults.
15. Sandlund JT, Guillerman RP, Perkins SL, et al. International pediatric non-Hodgkin lymphoma response criteria. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(18):2106-2111. doi:10.1200/JCO.2014.59.0745
16. Pillon M, Mussolin L, Carraro E, et al. Detection of prognostic factors in children and adolescents with Burkitt and Diffuse Large B-Cell Lymphoma treated with the AIEOP LNH-97 protocol. *British Journal of Haematology*. 2016;175(3):467-475. doi:10.1111/bjh.14240
17. Minard-Colin V, Aupérin A, Pillon M, et al. Rituximab for High-Risk, Mature B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma in Children. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(23):2207-2219. doi:10.1056/nejmoa1915315
18. Minard-Colin V, Aupérin A, Pillon M, et al. Rituximab for High-Risk, Mature B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma in Children. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(23):2207-2219. doi:10.1056/nejmoa1915315
19. Maloney DG, Smith B, Rose A. Rituximab: Mechanism of action and resistance. In: *Seminars in Oncology*. Vol 29. W.B. Saunders; 2002:2-9. doi:10.1053/sonc.2002.30156
20. Kridin K, Ahmed AR. Post-rituximab immunoglobulin M (IgM) hypogammaglobulinemia. *Autoimmunity Reviews*. 2020;19(3). doi:10.1016/j.autrev.2020.102466
21. Rui Z, Lim S, Liang Teh K, Das L, Arkachaisri T. SMJ Singapore Medical Journal Neutropenia following Rituximab in paediatric non-malignant diseases: case series and review of the literature ONLINE FIRST-ACCEPTED ARTICLES. doi:10.11622/smedj.2021188
22. Wolach O, Bairey O, Lahav M. Late-onset neutropenia after rituximab treatment: Case series and comprehensive review of the literature. *Medicine*. 2010;89(5):308-318. doi:10.1097/MD.0b013e3181f2caef
23. Tao L, Clarke CA, Rosenberg AS, et al. Subsequent primary malignancies after diffuse large B-cell lymphoma in the modern treatment era. *British Journal of Haematology*. 2017;178(1):72-80. doi:10.1111/bjh.14638
24. Meadows AT, Friedman DL, Neglia JP, et al. Second Neoplasms in Survivors of Childhood Cancer: Findings From the Childhood Cancer

- Survivor Study Cohort. *J Clin Oncol*. 2009;27:2356-2362.
doi:10.1200/JCO.2008.21.1920
25. Peuvrel L, Chiffolleau A, Quéreux G, et al. Melanoma and rituximab: An incidental association? *Dermatology*. 2013;226(3):274-278.
doi:10.1159/000350681
 26. Velter C, Pagès C, Schneider P, Osio A, Brice P, Lebbé C. Four cases of rituximab-associated melanoma. *Melanoma Research*. 2014;24(4):401-403.
doi:10.1097/CMR.0000000000000074
 27. K Lam CJ, Curtis RE, Dores GM, et al. Risk factors for second acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome among survivors of non-Hodgkin lymphoma. Published online 2016. doi:10.1038/leu.2015.248
 28. Barmettler S, Ong MS, Farmer JR, Choi H, Walter J. Association of Immunoglobulin Levels, Infectious Risk, and Mortality with Rituximab and Hypogammaglobulinemia. *JAMA Network Open*. 2018;1(7).
doi:10.1001/jamanetworkopen.2018.4169
 29. Labrosse R, Barmettler S, Derfalvi B, et al. Rituximab-induced hypogammaglobulinemia and infection risk in pediatric patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2021;148(2):523-532.e8.
doi:10.1016/j.jaci.2021.03.041
 30. Minard-Colin V, Brugières L, Reiter A, et al. Non-hodgkin lymphoma in children and adolescents: Progress through effective collaboration, current knowledge, and challenges ahead. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(27):2963-2974. doi:10.1200/JCO.2014.59.5827
 31. Kelaidi C, Tzotzola · v, Polychronopoulou · S. The paradigm of hematological malignant versus non-malignant manifestations, driven by primary immunodeficiencies: a complex interplay. 2021;20:363-380.
doi:10.1007/s10689-021-00266-w
 32. Makatsori M, Kiani-Alikhan S, Manson AL, et al. Hypogammaglobulinaemia after rituximab treatment-incidence and outcomes. *QJM*. 2014;107(10):821-828. doi:10.1093/qjmed/hcu094
 33. Veronique Minard-Colin, Anne Auperin, Marta Pillon, et al. Results of the randomized Intergroup trial Inter-B-NHL Ritux 2010 for children and adolescents with high-risk B-cell non-Hodgkin lymphoma (B-NHL) and mature acute leukemia (B-AL): Evaluation of rituximab (R) efficacy in addition to standard LMB chemotherapy (CT) regimen. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15).
 34. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. *Cellulare and Molecular Immunology*. Eight.; 2015.
 35. Li W. Pathogenesis and Pathology of Pediatric Lymphoma.
doi:10.36255/exon-publications.lymphoma.2021

36. Sacco KA, Abraham RS. Consequences of B-cell-depleting therapy: Hypogammaglobulinemia and impaired B-cell reconstitution. *Immunotherapy*. 2018;10(8):713-728. doi:10.2217/imt-2017-0178