



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

SCUOLA DI MEDICINA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA TRASLAZIONALE

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina e Chirurgia

Tesi di Laurea

***LENALIDOMIDE VS OSSERVAZIONE NEL LINFOMA
MANTELLARE: RISULTATI CLINICI E MOLECOLARI
A LUNGO TERMINE DI UNO STUDIO DI FASE III***

Relatore:

Chiar.mo Prof. Marco LADETTO

Candidato:

Aurora MAZZOCATO

Matricola 20022971

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

PERCORSO DI ECCELLENZA

Questa Tesi Sperimentale è stata svolta nel contesto del Percorso di Eccellenza presso il Reparto diretto dal Prof. *Marco Ladetto*, con il contributo della Dott.ssa *Rita Tavarozzi*, che ringrazio per aver condiviso con me i risultati della loro ricerca e per avermi affiancata nella stesura di questo elaborato.

Ringrazio, inoltre, *CELGENE*, la *Federazione Italiana Linfomi (FIL)*, il *Progetto di Ricerca Sanitaria Finalizzata 2021 (RF-2021-12371972)* e *AIL AL-ASTI ODV* per il supporto finanziario.

A chi trova se stesso nel proprio coraggio

INDICE

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Linfoma Mantellare	1
1.1.1 Epidemiologia	2
1.1.2 Classificazione	2
1.1.4 Patogenesi, citogenetica e genetica molecolare	5
1.1.5 Fattori prognostici	9
1.1.6 Stadiazione	15
1.1.7 Presentazione clinica	17
1.1.8 Diagnosi e diagnosi differenziali	20
1.1.9 Trattamento	22
1.2 Nuovi predittori di risposta al trattamento: MRD	32
1.2.1 Metodologie	32
1.2.2 Studi	35
1.2.3 Panorama attuale	37
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO	38
2.1 Premessa scientifica	38
2.1.1 FIL MCL0208: analisi primaria	38
2.1.2 MRD MCL0208: analisi primaria	40
2.2 Obiettivo dello studio	42
3. MATERIALI E METODI	44
3.1 Disegno dello studio	44
3.2 Criteri di inclusione e di esclusione	46
3.3 Trattamento e procedura	49
3.4 Raccolta dei dati e analisi statistica	51
3.4.1 Analisi clinica	51
3.4.2 Analisi MRD	52
4. RISULTATI CLINICI E MOLECOLARI	54
4.1 Risultati di efficacia	54

4.2 Risultati dell'analisi MRD	59
4.2.1 Valore predittivo dell'analisi MRD mediante confronto di tecniche, tessuti, marcatori e punti temporali	59
4.2.2 Modello cinetico MRD	62
5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI	63
6. BIBLIOGRAFIA	69

ABSTRACT

Lo studio di fase III FIL MCL0208 ha confrontato l'utilizzo di LEN per due anni con l'osservazione (OBS) dopo il trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) in giovani (<65 anni) con linfoma mantellare (MCL) precedentemente non trattato. Al punto di valutazione pre-pianificato, LEN ha mostrato una superiorità in PFS (senza beneficio in OS). Il trial ha incluso un ampio sottostudio MRD i cui risultati, limitati ai primi punti di rilevamento, hanno evidenziato l'alto valore prognostico dell'analisi MRD sia puntuale che cinetica.

Forniamo qui i risultati clinici e molecolari a lungo termine con un follow-up mediano (mFU) di 74 mesi dalla randomizzazione. Nella popolazione randomizzata abbiamo osservato una PFS a 72 mesi del 55% (44-65) in LEN rispetto al 50% (39-60) ($p = 0.175$). Il modello degli effetti variabili nel tempo ha mostrato un vantaggio in PFS a favore di LEN fino a 36 e 42 mesi ($p = 0.0314$), con una successiva diminuzione del beneficio in PFS nel follow-up successivo dopo 36 e 42 mesi ($p = 0.83$; $p = 0.57$). Non è stata osservata alcuna differenza in OS a lungo termine ($p = 0.819$). A 60 mesi, l'incidenza cumulativa di SM era del 9.4% (3.1-15.6) in LEN rispetto al 4.5% (0.1-8.8) in OBS ($p = 0.219$).

I risultati aggiornati hanno mostrato un persistente aumento del rischio di progressione dopo un risultato MRD positivo sia nel midollo osseo (HR = 4.17, 2.70-6.44) che nel sangue periferico (HR = 2.64, 1.69-4.12) anche considerando un follow-up a lungo termine, con una stabilità persistente nel tempo dei modelli cinetici basati sull'accumulo di risultati MRD negativi.

Il programma LEN di due anni qui impiegato fornisce un beneficio iniziale in PFS, che non viene mantenuto una volta interrotto. I risultati a lungo termine di MRD sottolineano ulteriormente il valore predittivo di questo strumento, in particolare nel contesto dei modelli cinetici.

1. INTRODUZIONE

1.1 Linfoma Mantellare

Il Linfoma Mantellare (MCL) è un Linfoma Non Hodgkin (LNH), noto nel passato come linfoma centrocitico, e deve il suo nome alla somiglianza morfologica e immunofenotipica che si può osservare tra le cellule neoplastiche e i linfociti della zona mantellare dei centri germinativi (1).

Il linfoma mantellare è stato identificato per la prima volta come entità clinico-patologica distinta solo agli inizi degli anni Novanta con la scoperta della specifica traslocazione cromosomica t(11;14), ma era già stato ben descritto dal punto di vista morfologico nel 1982 da Denis Weisenburger, che lo aveva definito come linfoma della zona mantellare. L'esistenza di un linfoma costituito interamente da cellule clivate, con un comportamento clinico diverso dagli altri linfomi di origine centrofollicolare era stata postulata già negli anni Settanta da Karl Lennert e dalla sua scuola di Kiel, che avevano coniato il termine di *linfoma centrocitico puro* (2). Il linfoma mantellare è stato riconosciuto definitivamente come un'entità distinta nella recente classificazione dei linfomi della WHO ed ha una storia naturale ed una prognosi nettamente peggiore dai linfomi di origine centrofollicolare e da quelli linfocitici che per molti anni sono stati inseriti nel gruppo ormai eterogeneo dei linfomi non-Hodgkin indolenti (3).

Caratterizzato storicamente da prognosi rapidamente progressiva e infausta, negli anni ha subito una radicale modifica della sua storia naturale. Infatti, grazie all'implementazione delle conoscenze biologiche e all'avvento di terapie innovative sempre più mirate ed efficaci, si è osservato un progressivo miglioramento nella sopravvivenza dei pazienti affetti da MCL.

Il linfoma mantellare è un *tumore dei linfociti B naïve*, cioè di cellule che non hanno avuto contatto con il centro germinativo. Si caratterizza, inoltre, per un'aggressività intermedia, ma un'estrema resistenza alla terapia, fattore che lo rende il candidato ideale per ulteriori studi in questo ambito e, pertanto, oggetto di questa Tesi. La trasformazione neoplastica deriva dall'acquisizione di alterazioni genetiche in grado di conferire alle cellule un vantaggio in termini di proliferazione e/o sopravvivenza rispetto alle loro controparti normali (4). L'origine delle cellule neoplastiche può avvenire negli organi linfatici centrali, come midollo osseo e timo, ma anche negli organi linfatici periferici, come linfonodi, milza o tessuto linfoide associato alle mucose (MALT); poi, nel loro decorso, possono interessare tutti gli organi e apparati (4).

1.1.1 Epidemiologia

Il linfoma mantellare rappresenta il 5-7% dei linfomi maligni nell'Europa occidentale e ha un'incidenza di 1-2 su 100.000 persone all'anno. Ha una prevalenza nei soggetti di sesso maschile con un rapporto uomo-donna di 3:1 e l'età media di insorgenza è di circa 65 anni (5). Inoltre, l'insorgenza del linfoma mantellare non vede ad oggi specifiche associazioni con agenti eziologici.

Alla diagnosi, la maggior parte dei pazienti presenta la forma disseminata della malattia. Infatti, il linfoma mantellare nel 90% dei casi si associa a una linfadenopatia diffusa, con disturbi gastrointestinali nel 60% dei casi e coinvolge il midollo osseo nel 55-80% dei casi (6).

1.1.2 Classificazione

La classificazione WHO (World Health Organization) per il linfoma mantellare, come per altri tipi di linfomi, fornisce una guida dettagliata sulla diagnosi e la classificazione dei linfomi (3). Essa distingue:

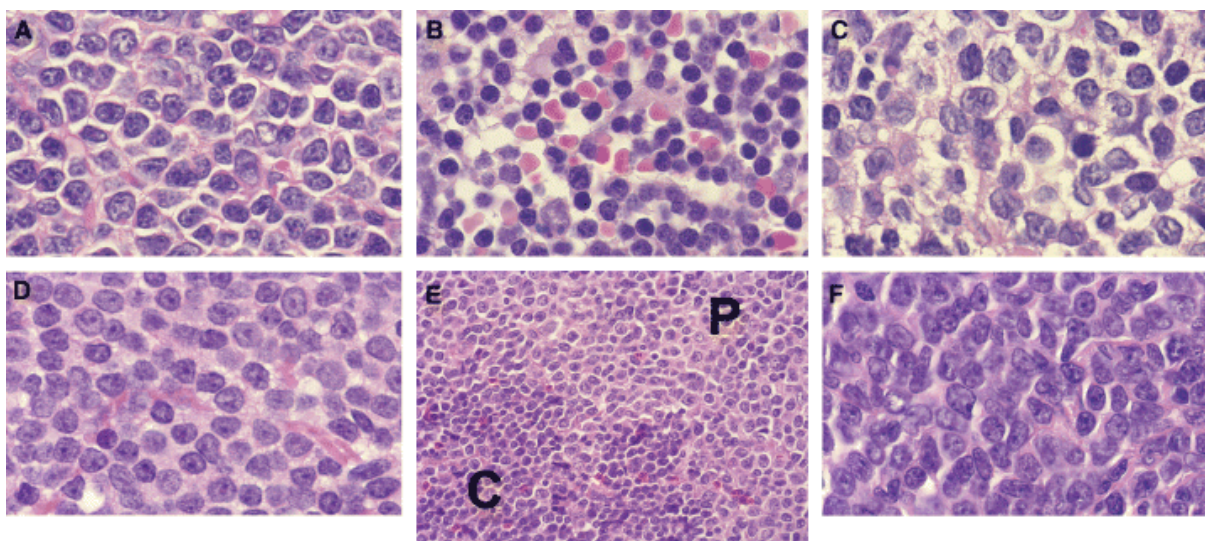
- *MCL classico*: è caratterizzata dalla presenza di un infiltrato linfocitario che coinvolge principalmente la zona del mantello del follicolo linfatico. È spesso associata alla presenza dell'oncogene BCL1 (ciclina D1) a causa della traslocazione t(11;14)(q13;q32). Questa forma rappresenta la maggior parte dei casi di linfoma mantellare (3).
- *Varianti*: la classificazione WHO riconosce anche alcune varianti meno comuni di linfoma mantellare, che possono differire nella loro presentazione clinica e istologica. Alcune di queste varianti includono il linfoma mantellare con reperti linfocitari marginali (MCL-MZB), il linfoma mantellare classico con reperti linfocitari marginali (cMCL-MZB) e altre varianti meno comuni (3).
- *Linfoma Mantellare con Caratteristiche Morfologiche Atipiche o Differenziazione Ibrida*: in alcuni casi, il linfoma mantellare può presentare caratteristiche morfologiche atipiche o una differenziazione ibrida con altri sottotipi di linfoma, come il linfoma linfoplasmacitico o il linfoma a cellule del mantello con reperti linfocitari marginali. Questi casi possono rappresentare sfide diagnostiche e richiedere approcci diagnostici e terapeutici specifici (3).

In microscopia ottica si possono definire 5-6 tipi di MCL; tuttavia, quello diverso come andamento clinico e più aggressivo degli altri è il sottotipo *blastoide*. Quindi, in definitiva, la

citologia è stata classificata come *classica*, *a piccole cellule* (simile alla leucemia linfatica cronica), *pleomorfa* o *blastica* (7).

Nello studio di Markus Tiemann et al., la rete europea MCL ha esaminato 304 casi di MCL per determinare il significato prognostico delle caratteristiche istopatologiche. Sono stati analizzati i sottotipi citomorfologici, il modello di crescita e i marcatori di proliferazione (indici mitotici e Ki-67, indice di proliferazione cellulare). Oltre ai sottotipi citologici noti, classico (87.5%), a piccole cellule (3.6%), pleomorfo (5.9%) e blastico (2.6%), sono stati identificati nuovi sottogruppi pleomorfi con miscele di cellule (tipo classico + pleomorfo; 1.6%) o transizioni (tipo classico/pleomorfo; 1.6%), che, tuttavia, non differivano significativamente nel tempo di sopravvivenza globale. Esattamente l'80,5% dei casi presentava un pattern di crescita diffuso, mentre il 19,5% dei casi presentava un pattern di crescita nodulare, associato ad una prognosi leggermente più favorevole (7).

FIGURA 1: sottotipi di linfoma mantellare in microscopia ottica



A classico; B piccole cellule, C pleomorfo, D blastoide, E classico e pleomorfo, F classico/pleomorfo

Il sottotipo *classico* (A) è caratterizzato da nuclei dentellati di piccole e medie dimensioni con cromatina moderatamente dispersa. Le cellule hanno un citoplasma scarso e pallido. La popolazione cellulare è determinata da cellule simili tra loro, con occasionali cellule neoplastiche più grandi e un basso tasso di proliferazione (7).

Il sottotipo *a piccole cellule* (B) ha nuclei piccoli rotondi o leggermente dentellati con cromatina nucleare densa. Questo lo rende simile al linfoma linfocitico/leucemia linfatica

cromica, con una mancanza di prolinfociti e paraimmunoblasti. In questo caso, il tasso di proliferazione è basso. Tipicamente, alcune cellule dendritiche follicolari sono mescolate a differenza della leucemia linfatica cronica (7).

Il sottotipo *pleomorfo* (C) mostra una commistione di cellule tumorali con nuclei di diverse dimensioni (medio-grandi) e forme (che imitano il linfoma a grandi cellule B). Le cellule hanno una quantità moderata di citoplasma e un alto tasso di proliferazione. Spesso, la variante pleomorfa mostra una miscela di blasti con nuclei dentellati e/o ovoidali con centrociti classici e un tasso più elevato di mitosi e apoptosi. È possibile una transizione continua dal tipo classico (7).

Il sottotipo *blastoide* (D) imita il linfoma linfoblastico/leucemia linfatica acuta con blasti di piccole e medie dimensioni con cromatina finemente dispersa e uno stretto bordo del citoplasma (7).

Il sottotipo *classico + pleomorfo* (E) consiste in una miscela di due popolazioni cellulari, una con citologia classica (C, lato sinistro) e l'altra con citologia pleomorfa (P, lato destro). Il sottotipo *classico/pleomorfo* è costituito da cellule che mostrano una citomorfologia simile a una transizione continua tra il tipo classico e quello pleomorfo (7).

Morfologicamente, quindi, le cellule neoplastiche possono avere un aspetto simile a piccoli linfociti B maturi o a cellule B della zona marginale, caratterizzate da citoplasma abbondante chiaro o aspetto monocitoide.

Il linfoma mantellare classico si presenta con cellule piccole o intermedie, caratterizzate da nuclei irregolari, nucleoli indistinguibili e cromatina densa. Ciò che rende più semplice la distinzione con le altre sottocategorie di linfoma, e soprattutto con il linfoma follicolare, è l'assenza di centroblasti e di immunoblasti (3,8).

La variante extranodale, che si presenta in maniera simile alla leucemia linfatica cronica (CLL), spesso ha un decorso più indolente (9).

Al contrario, la variante blastoide si caratterizza per la presenza di cellule neoplastiche simili a linfoblasti, quindi di dimensioni medio/grandi, con cromatina dispersa, nucleoli prominenti, alto tasso mitotico e alti livelli di proliferazione, fattori che configurano in un decorso clinico più aggressivo, dove un Ki-67 > 30% può avere un significato rilevante in termini prognostici (3,8,10).

Le cellule neoplastiche presentano aspetti simili ai linfociti della zona del mantello dei follicoli germinativi normali, da cui il nome *linfoma mantellare*. In questo tipo di linfoma, si

osserva un'espressione aberrante del marker CD5, glicoproteina transmembrana presente sui linfociti T, associata a una co-espressione di antigeni delle cellule B a variabile intensità (CD19, CD20, CD79a, immunoglobuline secretorie sIgM e sIgD).

Essendo l'origine delle cellule patologiche pre-germinale, si ha una positività per la colorazione con la proteina anti-apoptotica BCL-2, mentre una negatività per i marcatori del centro germinale, come BCL-6 e CD10 (2). A differenza della leucemia linfatica cronica, FMC7 e CD38 sono comunemente positivi, mentre è assente l'espressione di CD23 (8).

1.1.4 Patogenesi, citogenetica e genetica molecolare

La caratteristica genetica distintiva del linfoma mantellare è la *traslocazione cromosomica (11;14) (q13;q32)*. Si tratta, infatti, dell'evento oncogenetico cardine nella patogenesi della malattia, in quanto determina l'overespressione della ciclina D1 e una disregolazione del ciclo cellulare nella fase di transizione G1-S (11,12). In questa traslocazione cromosomica, il promotore del gene della catena pesante delle immunoglobuline situato sul cromosoma 14 è giustapposto al gene della ciclina D1 situato sul cromosoma 11, determinando un'overespressione della ciclina D1 (4). Bisogna tenere in considerazione, però, che la traslocazione t(11;14) da sola non è sufficiente a determinare la malattia, ma sono necessarie altre alterazioni genetiche, come mutazioni a carico di ATM, TP53 o P16/CDK2.

Nel linfoma mantellare, proprio a causa della sua forte eterogeneità morfologica, per confermare la diagnosi è fondamentale ottenere le caratteristiche genetiche, sia da un punto di vista immunoistochimico, dove si osserva l'overespressione della ciclina D, sia tramite la FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*), che mette in evidenza la traslocazione cromosomica t(11;14) (q13;q32). Esistono anche rari casi negativi per la ciclina D1, in cui si osserva un'overespressione della ciclina D2 o della ciclina D3 (3). Bisogna considerare che le cicline sono una famiglia di proteine che regolano la progressione del ciclo cellulare tramite la formazione di un complesso con l'enzima chinasi ciclina-dipendente (CDK). Il loro nome deriva dal fatto che la loro concentrazione varia ciclicamente durante il ciclo cellulare, in quanto la loro produzione e degradazione è necessaria per dirigere la progressione dei differenti stadi del ciclo stesso.

Inoltre, per la diagnosi, può essere d'aiuto la colorazione per SOX11, fattore di trascrizione specificatamente espresso in più del 90% dei casi di linfoma mantellare. Infine, a scopo diagnostico, è importante distinguere il linfoma mantellare *classico* dalla forma *in situ*:

si osserverà l'overespressione della ciclina D1 e di CD5 e una debole positività per BCL-2, con un coinvolgimento limitato alla zona del mantello interna (13).

A questo si aggiunge l'attivazione costitutiva del recettore delle cellule B (B-cell receptor, BCR) e del suo pathway di segnalazione a valle, fattore che gioca un ruolo rilevante nello sviluppo della malattia. Il pathway di segnalazione attraverso il recettore delle cellule B è fondamentale per lo sviluppo e il mantenimento delle cellule B, motivo per cui non sorprende la sua implicazione nella crescita e nella sopravvivenza delle cellule neoplastiche. Tuttavia, prove dirette del suo coinvolgimento nei linfomi sono emerse solo di recente, rendendolo anche un importante target terapeutico. A questo proposito, un ruolo importante è svolto dalla tirosina chinasi di Bruton (BTK), che è un mediatore della via di segnalazione del BCR, implicata nella patogenesi dei tumori delle cellule B: il farmaco *ibrutinib*, un inibitore della BTK, ha mostrato attività antitumorale in diversi tipi di linfoma non Hodgkin, compreso il linfoma a cellule mantellari (14–16).

Sono state evidenziate in aggiunta numerose alterazioni genetiche secondarie e mutazioni ricorrenti che influenzano la regolazione del ciclo cellulare, la risposta nei confronti del danno al DNA e le vie apoptotiche e si è osservato il loro contributo nella patogenesi e nell'aggressività del linfoma mantellare. A questo proposito, le mutazioni del gene ATM (Ataxia-Teleangectasia Mutant) aumentano l'instabilità genomica nelle cellule di linfoma tramite un'alterata risposta ai danni del DNA. Due target importanti connessi a questa via di segnalazione sono la fosfoinositide 3-chinasi (PI3K), una famiglia di enzimi coinvolti nei meccanismi che permettono la crescita cellulare, la proliferazione, la differenziazione, la motilità e la sopravvivenza intracellulare, e il bersaglio meccanicistico della rapamicina (mTOR), una proteina chinasi che fosforila serina e treonina, regolando la crescita, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza delle cellule, la sintesi proteica e la trascrizione (4).

Una caratteristica importante del linfoma mantellare da tenere in considerazione è la forte instabilità genomica. Si tratta, infatti, di uno dei linfomi con il più alto livello di instabilità. Tra le alterazioni genetiche che si possono ritrovare, si osservano delezioni cromosomiche 1p13-p31, 2q13, 6q23-27, 8p21, 9p21, 10p14-15, 11q22-23, 13q11-13, 13q14-34, 17p13 e 22q12; duplicazioni cromosomiche 3q25, 4p12-13, 7p21-22, 8q21, 9q22, 10p11-12, 12q13 e 18q11q23 e amplificazioni ad alto numero di copie in alcune regioni cromosomiche (17,18).

Per riassumere, le mutazioni maggiormente ricorrenti nella patogenesi del linfoma mantellare sono (19):

- *Overespressione ciclina D1*: la traslocazione cromosomica t(11;14) (q13;q32) si ritrova nella maggior parte dei casi di MCL e questo determina un'overespressione della ciclina D, che attiva le chinasi ciclina-dipendenti (CDK) 4 e 6, che a loro volta fosforilano e inattivano Rb (un gene soppressore del tumore) e promuovono la transizione dalla fase G1 alla fase S. La ciclina D1 interagisce anche con il rimodellamento della cromatina, gli enzimi che modificano gli istoni e i fattori di trascrizione e danneggia il trascrittoma (20).
- *Delezione CDKN2A*: il gene CDKN2A codifica per un inibitore della chinasi ciclina-dipendente che inibisce specificamente CDK4 e CDK6, mantenendo attivo Rb1 e per una ubiquitina-proteina ligasi E3, che stabilizza TP53 interagendo con MDM2, prevenendone la degradazione. Questa delezione si verifica in circa il 20%–25% dei MCL ed è associata a istologia aggressiva (21).
- *Amplificazione CDK4*: si associa alla promozione della disregolazione del ciclo cellulare e, di conseguenza, a un'istologia aggressiva di tipo blastoide (22).
- *Mutazioni gene CCND1*: sono state osservate nel MCL non nodale.
- *MCL criptico atipico ciclina D1-positivo*: in casi insoliti, possono esistere traslocazioni alternative della ciclina D1, come t(2;11) (p11;q13), dove si osserva un riarrangiamento della ciclina D1 a livello della catena leggera, mantenendo comunque l'immunoistochimica per la ciclina D1 positiva.
- *MCL atipico ciclina D1-negativo*: in meno dell'1%-2% dei pazienti con MCL, la ciclina D1 non è rilevabile né dall'immunoistochimica né dalla FISH. Sono questi i casi in cui si possono osservare riarrangiamenti del gene della ciclina D2 o della ciclina D3 o sovraregolazione della ciclina E (3). In situazioni molto rare, tutte le cicline D1, D2 e D3 possono essere negative (MCL triplo negativo).
- *Overespressione di SOX-11*: SOX-11 è un fattore di trascrizione neurale codificato dal gene SOX11, situato sul cromosoma 2p25. La maggior parte delle cellule MCL

overesprimono SOX-11, ad eccezione della variante leucemica non nodale, in cui SOX-11 è generalmente negativo (13).

- *Aberrazioni epigenetiche*: la metilazione del DNA, la modificazione degli istoni e l'organizzazione cromatica sono strettamente coinvolte nella patogenesi del MCL.
- *Instabilità genomica*: un grado più elevato di aneuploidia è una caratteristica del MCL con istologia aggressiva.
- *Mutazioni TP53*: le alterazioni nell'oncosoppressore TP53 mediante delezione o mutazioni possono promuovere l'instabilità genomica, la sovraregolazione del ciclo cellulare, l'inibizione dell'apoptosi e una maggiore proliferazione. Le mutazioni di TP53, infatti, si associano a un decorso aggressivo della malattia (23).
- *Mutazioni ATM*: si osservano in circa il 30%-50% dei casi di MCL alla diagnosi iniziale. L'ATM è strettamente associato alla riparazione dei danni al DNA e svolge un ruolo importante nella regolazione della progressione del ciclo cellulare.
- *Fosforilazione ossidativa*: si associa a resistenze farmacologiche.
- *Microambiente*: le interazioni cellulari nel microambiente del tessuto MCL e l'interazione delle citochine sono vitali per supportare la crescita cellulare.
- *Varie aberrazioni*: mutazioni troncanti con guadagno di funzione nei geni NOTCH1 e NOTCH2 mediano la resistenza all'apoptosi e inducono l'espressione di MYC (24). La mutazione della proteina ligasi dell'ubiquitina (UBR5) è associata alla trasformazione del blastoide e alla maturazione delle cellule B nel MCL. Altre mutazioni somatiche aberranti includono BIRC3, KMT2D e WHSC1.

Nonostante queste conoscenze, il riscontro prognostico e funzionale delle mutazioni somatiche rimane sconosciuto per la maggior parte delle mutazioni ed è attuale fonte di ricerca (17,18). Le mutazioni genetiche che sono state descritte a livello di TP53 e NOTCH1/2 sono, invece, associate a un basso outcome clinico (17,23,25–27).

1.1.5 Fattori prognostici

Tra i principali fattori prognostici è possibile individuare fattori prognostici alla diagnosi e fattori prognostici alla recidiva di malattia.

Fattori prognostici alla diagnosi

- **MIPI**

Lo score prognostico maggiormente utilizzato è il *MCL International Prognostic Index* (MIPI), confermato in diversi trial clinici randomizzati (28,29). Il MIPI è costituito da quattro fattori prognostici indipendenti:

- *Età*
- *Performance status*
- *Lattato deidrogenasi (LDH)*
- *Conta leucocitaria*

TABELLA 1: MIPI semplificato

Punti	Età	ECOG	LDH	GB (10 ⁹ /l)
0	<50	0-1	<0.67	<6.700
1	50-59	-	0.67–0.99	6700–9.999
2	60-69	2-4	1.00–1.49	10.000–14.999
3	>70	-	≥1.50	≥15.000

[Fonte: Dreyling M et al., *Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma:*

ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2014]

Per ciascun fattore prognostico, vengono assegnati 0-3 punti a ciascun paziente e i punti vengono sommati fino a un massimo di 11. I pazienti con 0-3 punti sono stati classificati come a *basso rischio*, i pazienti con 4-5 punti come a *rischio intermedio* e i pazienti con 6-11 punti come ad *alto rischio*. Il performance status ECOG è stato ponderato con 2 punti se i pazienti non erano in grado di lavorare o erano costretti a letto (ECOG 2-4). L'LDH è stato ponderato in base al rapporto con il limite superiore del range normale.

Il performance status, nello specifico, indica lo stato di validità generale del paziente, tramite una valutazione delle condizioni generali, che può essere effettuata tramite diverse scale: le più utilizzate sono la *scala di Karnofsky* e la *scala ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group)*, riportate in seguito (30).

TABELLA 2: indice di performance di Karnofsky

PS	Capacità funzionale del paziente
100	Non lamenta sintomi, nessun segno di malattia.
90	Svolge le normali attività, segni o sintomi di malattia limitati.
80	Svolge le normali attività con difficoltà, alcuni segni o sintomi evidenti.
70	In grado di badare a se stesso; incapace di svolgere le attività normali o un lavoro attivo.
60	Ha bisogno di assistenza occasionale, ma indipendente per la maggior parte delle esigenze.
50	Ha bisogno di assistenza e controlli medici frequenti.
40	Disabile, necessario un aiuto specializzato.
30	Severamente disabile, ospedalizzazione necessaria, ma senza rischio di morte.
20	Estremamente malato, richiede ospedalizzazione e misure intensive di supporto terapeutico.
10	Malato terminale, vicino al decesso.
0	Deceduto.

[Fonte: Jameson et al., Harrison, Principi di Medicina Interna, 20esima edizione, cea]

TABELLA 3: scala di performance ECOG

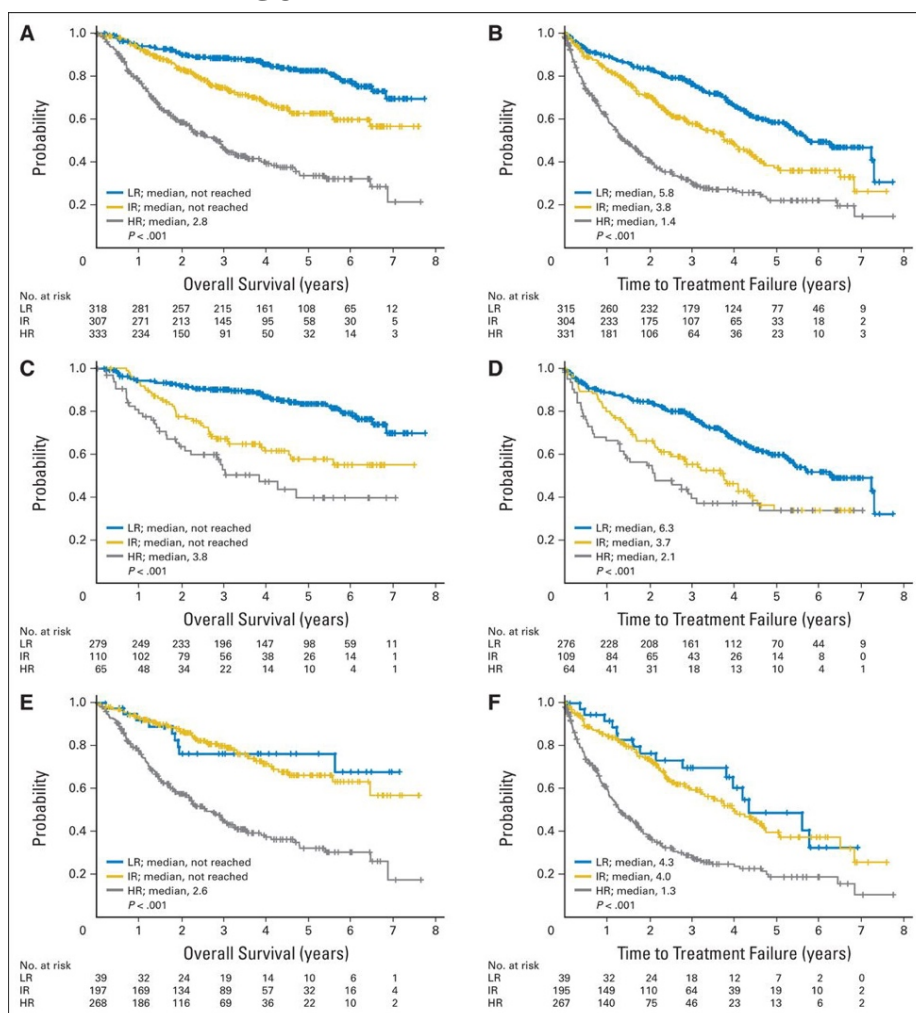
PS	
0	Completamente attivo, in grado di portare a termine tutte le prestazioni premalattia senza alcuna restrizione
1	Limitato nell'eseguire attività fisica faticosa, ma con capacità di deambulazione e in grado di svolgere lavori di natura leggera o sedentaria (piccoli lavori domestici o lavoro d'ufficio).
2	Deambulante e capace di prendersi totalmente cura di sé, ma impossibilitato a svolgere qualsiasi attività lavorativa; in piedi fino a circa il 50% delle ore di veglia.
3	Capacità limitata a prendersi cura di sé, limitato al letto o alla sedia 50% o più delle ore di veglia.
4	Completamente disabile; non è possibile eseguire alcuna cura personale; totalmente limitato al letto o alla sedia.
5	Deceduto.

[Fonte: M.M. Oken et al., Am J Clin Oncol, 5:649, 1982]

Come si può osservare nelle attuali linee guida, il MIPI rappresenta uno strumento prognostico generalmente applicabile, da utilizzare nella ricerca così come nella routine clinica e può aiutare a sviluppare strategie di trattamento adattate al rischio per migliorare ulteriormente i risultati clinici nel MCL.

Da questi studi si è visto che i tassi di overall survival (OS) a cinque anni nei gruppi MIPI a rischio basso, intermedio e alto erano rispettivamente dell'83%, 63% e 34% ($P < 0,001$). I rapporti di rischio per l'overall survival dei pazienti a rischio intermedio rispetto a quello basso e alto rispetto a quello intermedio erano rispettivamente 2,1 (IC al 95%, da 1,5 a 2,9) e 2,6 (da 2,0 a 3,3). Inoltre, tutti i fattori MIPI hanno rivelato un impatto prognostico indipendente con rapporti di rischio 1,6 per un aumento dell'età di 10 anni, 1,9 per ECOG PS 2, 2,0 per LDH doppio e 1,9 per una conta leucocitaria 10 volte maggiore (29).

FIGURA 2: OS e TTF secondo MIPI



[Fonte: Hoster E, et al., Confirmation of the mantle-cell lymphoma International Prognostic Index in randomized trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol.* 2014 May 1.]

In *figura 2* si può osservare la sopravvivenza globale (OS) e il tempo al fallimento del trattamento (TTF) secondo l'indice prognostico internazionale (MIPI) in studi raggruppati e stratificati per coorte di studi.

(A) mostra l'OS in studi clinici aggregati (54, 88 e 174 eventi rispettivamente nei gruppi a basso rischio [LR], a rischio intermedio [IR] e ad alto rischio [HR]) e (B) il TTF in studi combinati (rispettivamente 115, 140 e 219 eventi); (C) l'OS mostra nel giovane (45, 41 e 31 eventi, rispettivamente) e (D) il TTF nel giovane (99, 57 e 38 eventi, rispettivamente); (E) mostra l'OS nell'anziano (9, 47, e 143 eventi, rispettivamente) e (F) il TTF nell'anziano (rispettivamente 16, 83 e 181 eventi). I valori P di interazione dei gruppi di rischio MIPI e della coorte dello studio erano 0,041 per l'OS e 0,051 per il TTF (29).

Nonostante l'importanza del MIPI, i fattori prognostici più importanti, indipendenti dalle caratteristiche cliniche, sono il tasso di proliferazione e il livello di espressione di geni legati alla proliferazione (31,32): è stata identificata una firma genetica nella proliferazione cellulare che permette di distinguere i pazienti che differiscono per più di 5 anni nella sopravvivenza mediana. A questo proposito, è presente uno studio che ha analizzato, tramite il test di proliferazione MCL35, la firma della proliferazione dell'espressione genica in campioni di linfonodi diagnostici di routine. Lo studio ha confermato che il test MCL35 basato sulla piattaforma NanoString è un biomarcatore prognostico affidabile nei pazienti con MCL per identificare sottogruppi con esiti diversi tramite un punteggio basato sulla proliferazione. Dato che l'indice Ki67, ampiamente utilizzato, è soggetto a una significativa variabilità interlaboratorio e tra osservatori, la misurazione della proliferazione basata sull'espressione genica utilizzando il test MCL35 potrebbe essere utile per supportare le decisioni terapeutiche e le strategie adattate al rischio in futuro test clinici (32).

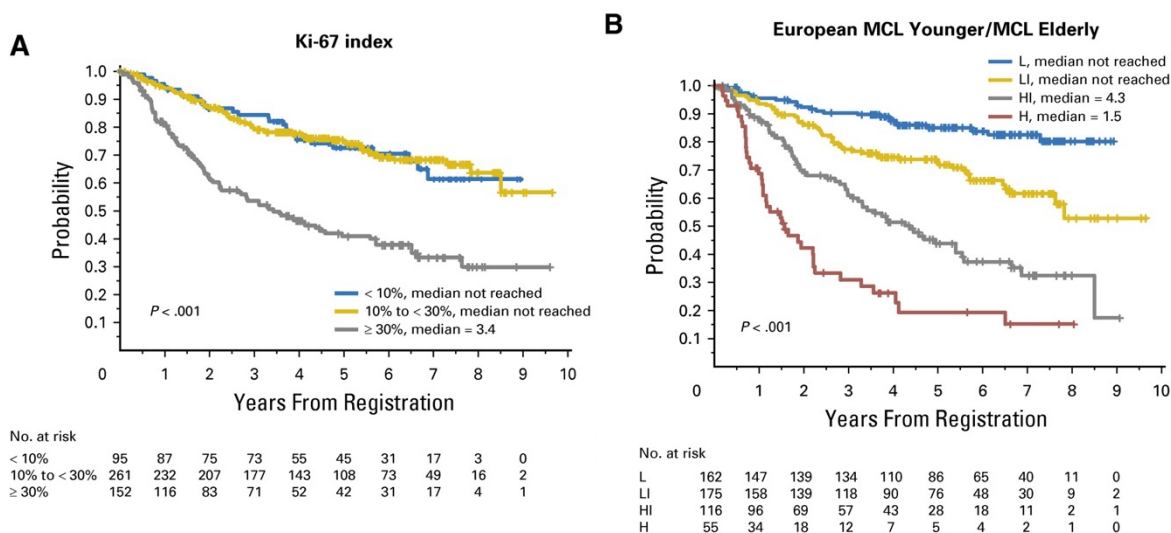
- **MIPI-c**

Uno dei fattori prognostici più importanti nel contesto clinico è l'espressione di Ki67, determinata in immunistochemica. La combinazione di questa proteina correlata al ciclo cellulare con il MIPI (MIPI-c) è uno strumento altamente raccomandato per stimare il profilo di rischio individuale e per identificare i pazienti ad alto rischio (Ki67 > 30%), i quali possono qualificarsi per trattamenti maggiormente aggressivi (33,34).

Nello studio relativo all'applicazione dell'indice Ki67 nel linfoma mantellare, questo è stato valutato in 508 pazienti su 832 (età mediana 62 anni). La citologia blastoide, inoltre, era associata a un'OS inferiore indipendentemente dal MIPI, ma non indipendentemente dall'indice

Ki67. Si è visto che l'uso dell'indice Ki67 è superiore all'uso della citologia e del modello di crescita come fattori prognostici nel MCL. La combinazione modificata dell'indice Ki67 e del MIPI, inoltre, ha mostrato un'ottima stratificazione del rischio, riflettendo i loro forti effetti prognostici complementari e integrando al tempo stesso i fattori prognostici più rilevanti disponibili nella routine clinica (10).

FIGURA 3: OS associate a Ki67 e MIPIc



[Fonte: Hoster E, et al., Prognostic Value of Ki-67 Index, Cytology, and Growth Pattern in Mantle-Cell Lymphoma: Results From Randomized Trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol.* 2016 Apr 20].

In figura 3 A si osserva la sopravvivenza globale in relazione all'indice Ki-67 utilizzando valori di cut-off precedentemente stabiliti del 10% e 30%, mentre in B è presentata la sopravvivenza globale secondo la combinazione modificata dell'indice Ki-67 e del MIPI, denominato MIPI combinato (MIPI-c) (10). Questo dimostra come la combinazione dei due indici, Ki-67 e MIPI, sia molto precisa nel definire la stratificazione del rischio, integrando i vantaggi delle due metodiche.

- **Mutazioni di TP53**

Le mutazioni di TP53 sono associate a una prognosi sfavorevole, con una ridotta sopravvivenza globale e un aumento del rischio di ricaduta. Infatti, le aberrazioni molecolari nel MCL influenzano la patogenesi, la prognosi e la risposta terapeutica (35).

Le aberrazioni del gene TP53 (mutazioni o delezioni) rappresentano un fattore di rischio ben consolidato nell'MCL (27). Le mutazioni di TP53 sono state associate alla via di MYC attivata, iperproliferazione, delezioni del 9p e peggiore prognosi clinica.

Alla diagnosi, la frequenza delle mutazioni di TP53 è di circa il 11%–25%; la frequenza aumenta al 45% alla ricaduta (35). Un gruppo nordico (23) ha riportato un tasso di frequenza delle mutazioni di TP53 dell'11% alla diagnosi iniziale; le durate mediane della sopravvivenza complessiva sono state di 1.8 anni nei pazienti con aberrazioni di TP53 rispetto a 12.7 anni nei pazienti senza aberrazioni di TP53.

La presenza sia della delezione di TP53 (rilevata tramite FISH) che delle mutazioni di TP53 (rilevate tramite sequenziamento del DNA) è stata associata a una sopravvivenza peggiore. Le mutazioni del gene TP53 possono coesistere con altre aberrazioni come la mutazione di NOTCH1 (71%), la delezione di CDKN2A (del 9p21) (31%) e la delezione di TP53 (del 17p13) (31%). Le mutazioni di TP53, inoltre, possono coesistere con mutazioni di NSD2 nei pazienti con resistenza a *ibrutinib* (36).

Fattori prognostici alla recidiva

- *POD24*

POD24 (*Progression Of Disease before 24 months*) indica la progressione della malattia entro i primi 24 mesi dal trattamento iniziale. POD24 è un indicatore importante utilizzato per valutare la risposta al trattamento e la prognosi nei pazienti affetti da diverse malattie, compreso il linfoma mantellare; esso, infatti, misura la velocità con cui la malattia progredisce dopo il trattamento iniziale e può influenzare significativamente l'esito clinico dei pazienti (37).

L'impatto prognostico del POD24 è stato confermato dallo studio di Eskelund et al., che ha valutato gli esiti dopo la ricaduta di 149 pazienti che sono stati inizialmente trattati nei trial del Gruppo Linfoma Nordico, MCL2 o MCL3. I pazienti con progressione della malattia prima dei 24 mesi (POD24, n=51,34%) hanno mostrato una sopravvivenza complessiva mediana di 6.6 mesi rispetto ai 46 mesi per i pazienti con POD successivi (n=98, 66%; P<0.001) (38). L'indice prognostico internazionale del MCL, il marcatore di proliferazione cellulare, la morfologia blastoide e le mutazioni di TP53 hanno mostrato un valore prognostico indipendente indipendentemente dal POD24.

1.1.6 Stadiazione

Attualmente, così come per gli altri linfomi, anche nel MCL, la classificazione in stadi si basa sulla revisione di Lugano del sistema Ann Arbor/Costwolds, che utilizza come parametri il numero di localizzazioni e le sedi interessate dal linfoma, andando a definire quattro stadi di malattia (I-IV). Sulla base della revisione di Lugano il riferimento alla presenza di sintomi B (sudorazioni notturne, febbre, calo ponderale superiore al 10% negli ultimi 6 mesi) attualmente è raccomandato solo per i Linfomi di Hodgkin (LH). Inoltre, in presenza di malattia bulky (voluminosa) è richiesta solo l'indicazione del diametro maggiore della lesione ed è stato stabilito a 13 cm il diametro massimo di normalità per la milza. Ulteriori novità apportate dalla revisione di Lugano riguardano l'utilizzo della PET nei linfomi avidi di FDG e la semplificazione del processo di stadiazione, per cui in determinati casi può essere anche omessa l'esecuzione della biopsia osteomidollare (39).

TABELLA 4: revisione di Lugano della stadiazione di Ann Arbor

Stadio	Sedi interessate
I	Unica regione linfonodale (I) o singola sede extralinfatica (IE)
II	Due o più regioni linfonodali dallo stesso lato del diaframma (II) o estensione locale extralinfatica e una o più regioni dallo stesso lato del diaframma (IIE)
III	Regioni linfonodali in entrambi i lati del diaframma, (III), accompagnate o meno da un'estensione locale extralinfatica (IIIE).
B*	Presenza di almeno di uno dei seguenti sintomi: <ul style="list-style-type: none">- Perdita di peso >10% del peso abituale negli ultimi 6 mesi- Febbre ricorrente >38°- Sudorazione notturna inspiegabile Le sudorazioni notturne da sole non influenzano da sole negativamente la prognosi e il prurito, non più considerato tra i criteri di Ann Arbor come sintomo B, acquisisce importanza di sintomo sistemico qualora sia ricorrente, generalizzato e altrimenti inspiegabile.
bulky	LH: singola massa delle dimensioni >10 cm nel diametro maggiore o massa mediastinica >1/3 del diametro trasverso del torace misurato con TC. LNH: non esiste una definizione condivisa; nello stadio si riporterà il diametro massimo della lesione linfonodale maggiore.

[Fonte: Linee Guida AIOM Linfomi, 2018]

*da utilizzare solo per LH

La valutazione dello stadio di malattia nel MCL si basa essenzialmente sull'esecuzione della PET e della biopsia osteomidollare. Sono, inoltre, raccomandate la TC del collo, del torace e dell'addome.

La PET-TC si è dimostrata particolarmente utile nei LNH avidi di glucosio, tra cui il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), il linfoma follicolare (FL) e il linfoma mantellare (MCL), dove si è dimostrata una maggiore accuratezza diagnostica, tale da portare a un cambiamento dello stadio clinico nel 10-30% dei casi (4).

TABELLA 5: scala di Deauville

Deauville Score	captazione fluorodesossiglucosio (FDG)
1	No uptake superiore al background
2	Uptake minore o uguale a quello del mediastino
3	Uptake maggiore di quello del mediastino, ma inferiore o uguale a quello del fegato
4	Uptake moderatamente superiore rispetto a quello del fegato
5	Uptake notevolmente superiore a rispetto a quello del fegato o comparsa di nuove localizzazioni captanti FDG
X	Presenza di nuove aree di uptake non correlate al linfoma

[Fonte: AIOM (Associazione Italiana Oncologia Medica), Linee Guida LINFOMI, Edizione 2017]

Poiché i LNH sono molto eterogenei in termini di prognosi, sono stati studiati diversi indici utili a stratificare i pazienti in classi di rischio, prima ancora che venga somministrato il trattamento.

I criteri che vengono attualmente utilizzati, poi, per valutare la risposta al trattamento sono stati revisionati secondo la classificazione di Lugano, che prevede:

- *Remissione completa* (RC): assenza di localizzazioni di malattia e di sintomi ad essa legati. Rientrano in questa categoria i pazienti con PET positiva all'esordio e PET negativa (scala di Deauville 1-3, *tab. 5*) al termine del trattamento, indipendentemente dalla TC.
- *Remissione parziale* (RP): riduzione superiore al 50% delle linfadenopatie, in assenza di nuove lesioni o aumento volumetrico in altre sedi di malattia; i noduli splenici ed

epatici devono ridursi almeno del 50%. Si considera comunque in remissione parziale il paziente con PET positiva (Deauville 4-5, *tab. 5*) solo se su sedi iniziali di malattia non aumentate di volume.

- *Malattia stabile*: mancanza di criteri per RC o RP o progressione di malattia. Rientrano in questa categoria i pazienti con PET positiva (Deauville 4-5, *tab. 5*), senza la comparsa di nuove localizzazioni.
- *Progressione di malattia*: comparsa di nuove localizzazioni e/o aumento superiore al 50% delle linfadenopatie iniziali. Si parla di progressione di malattia nei pazienti con PET positiva (Deauville 5, *tab. 5*).

Per la stadiazione, all'imaging si associano anche l'esecuzione dell'aspirato midollare e della biopsia osteomidollare. Questi verranno utilizzati per gli studi citogenetici (FISH), per gli studi molecolari (PCR) e per l'analisi in citofluorimetria, che permettono di definire con precisione la tipologia di linfoma (4).

Bisogna tenere in considerazione, inoltre, che gli esami previsti per la stadiazione verranno ripetuti al termine del trattamento o in caso di recidiva per ottenere il *re-staging* del linfoma stesso.

L'esecuzione dell'endoscopia del tratto gastrointestinale, invece, andrebbe limitata a pazienti sintomatici o con malattia localizzata (nel 60% dei casi è documentata un'infiltrazione microscopica e asintomatica del tubo digerente) (4).

Se si sospetta clinicamente il coinvolgimento del SNC, è necessario integrare la diagnostica liquorale.

1.1.7 Presentazione clinica

Il MCL è clinicamente molto eterogeneo. Nella maggioranza dei casi di *variante classica o nodale*, esso si presenta con linfadenopatie disseminate. La maggior parte dei pazienti alla diagnosi, inoltre, presenta la malattia in uno stadio avanzato (stadio III o stadio IV Ann Arbor).

Le manifestazioni extranodali si possono osservare nel 90% dei pazienti. Tra queste sono comprese l'infiltrazione del midollo osseo (53-82%), il sangue (50%), il fegato (25%) e il tratto gastrointestinale (20-60%), dove si presenta come *polyposis coli*. La milza è ingrossata nel 40% dei pazienti (5).

Per quanto riguarda il coinvolgimento del tratto gastrointestinale nei pazienti con linfoma mantellare, la frequenza riportata in letteratura è del 15-30%. Tuttavia, questa cifra molto probabilmente è sottostimata perché la maggior parte dei pazienti con MCL che coinvolge il tratto gastrointestinale vengono esaminati endoscopicamente solo se presentano sintomi del tratto gastrointestinale. Lo studio specifico eseguito da Romaguera et al. sulla frequenza di coinvolgimento del tratto gastrointestinale ha dimostrato che, sebbene solo il 26% dei pazienti presentava sintomi gastrointestinali al momento della diagnosi, il MCL era presente istologicamente nel tratto gastrointestinale inferiore in 53 pazienti su 60 (88%) e nel tratto gastrointestinale superiore di 28 pazienti su 58 (43%). Inoltre, sono state dimostrate evidenze microscopiche di MCL sono state nell'84% dei pazienti con risultati macroscopici normali mediante endoscopia inferiore e nel 45% dei pazienti con risultati macroscopicamente normali mediante endoscopia superiore. Nonostante questa alta frequenza di coinvolgimento del tratto gastrointestinale, l'uso dell'endoscopia superiore e inferiore con biopsie in questo gruppo di pazienti ha portato a cambiamenti nella gestione clinica solo in tre (4%) pazienti (40), motivo per cui questa viene ancora riservata solamente ai pazienti che presentano la sintomatologia. Questo studio, però, dimostra il forte coinvolgimento presente a questo livello.

La variante classica o nodale si associa a una proliferazione di elementi neoplastici caratterizzati da una assenza di mutazioni somatiche dei geni che codificano per le regioni variabili delle immunoglobuline e per l'espressione della molecola SOX11 (4).

La *variante leucemica*, più rara, vede un coinvolgimento a livello del sangue periferico, del midollo osseo e della milza, senza significative linfadenopatie. Questi casi sono spesso caratterizzati da un decorso clinico più indolente, sono associati a un indice Ki67 molto basso e alla mancata espressione di SOX11. Morfologicamente, le cellule neoplastiche hanno l'aspetto di piccoli linfociti, simili a quelli della leucemia linfatica cronica B, con mutazioni somatiche nelle regioni variabili dei geni delle immunoglobuline e una stabilità genomica maggiore. Clinicamente, spesso si osserva la manifestazione leucemica in combinazione con una splenomegalia massiccia (9).

La forma indolente leucemica può, tuttavia, trasformarsi nella forma classica di linfoma mantellare, talora con una morfologia blastoide o pleiomorfa e acquisizione di mutazioni a carico di TP53.

Due varianti cliniche più rare sono la *poliposi multipla linfomatosa* e il *linfoma mantellare in situ*. La prima si manifesta con localizzazione plurifocale a livello del colon e

dell'intestino tenue, mentre la seconda vede la presenza di una localizzazione singola e non di linfadenopatie disseminate, come nella variante classica (4).

La frequenza di malattia a carico del SNC è bassa alla prima diagnosi, ma aumenta con le ricadute successive, arrivando a riguardare il 5-10% dei casi (4), e correla con alti livelli di LDH, una citologia blastoide e con la proliferazione cellulare evidenziata tramite il Ki67 (41).

I pazienti con MCL presentano comunemente sintomi B o sintomi associati alla sede della malattia. I pazienti possono essere asintomatici con o senza linfocitosi (4). Le presentazioni cliniche iniziali del MCL possono essere:

- *MCL indolente* (a crescita lenta e asintomatico; raro): nella maggior parte dei casi, il paziente si presenta come asintomatico e/o senza sintomi B (sudorazione notturna abbondante, perdita di peso involontaria >10% del peso corporeo normale in un periodo di 6 mesi o meno, febbre >38°C).
- *MCL non nodale leucemico asintomatico* (non comune): si caratterizza per linfocitosi nel sangue periferico con o senza splenomegalia. Generalmente è negativo per l'espressione di SOX11 nelle biopsie e presenta geni IGHV mutati.
- *MCL classico* (più comune): viene definito come MCL triplo positivo, per il coinvolgimento nodale/non nodale, il coinvolgimento del midollo osseo e il coinvolgimento del tratto gastrointestinale da parte del MCL. In questo caso, la malattia è sintomatica a livello dei linfonodi voluminosi o nelle localizzazioni extranodali (quali SNC, tratto gastrointestinale, tonsille, pelle, ecc.). Viene ulteriormente classificato in base al punteggio di rischio MIPI e del Ki-67%.
- *MCL clinicamente convenzionale, ma con patologia atipica* (molto raro): si distinguono ulteriori sottogruppi:
 - Forma in cui l'immunoistochimica per la ciclina D1 è negativa, ma la FISH è positiva per la traslocazione t(11;14) (q13;q32) a causa di mutazioni CCND1 o della mutazione nell'estremità 3' C-terminale della ciclina D che compromette il legame dell'anticorpo o ancora di mutazioni nelle isoforme della ciclina D (1a e 1b);

- Forma in cui l'immunoistochimica per la ciclina D1 è positiva, ma la FISH è negativa per la traslocazione t(11;14) (q13;q32) a causa di traslocazione criptica nelle catene leggere non IgH – IGK (2;11) e/o IGL;
- Forma in cui l'immunoistochimica per la ciclina D1 è negativa e anche la FISH per la traslocazione t(11;14) (q13;q32) è negativa. Si tratta del MCL negativo alla ciclina D1, ma positivo alla ciclina D2 o D3; in rari casi, i pazienti possono avere MCL tripla ciclina D-negativo (negativo per D1, D2 e D3), ovvero MCL ciclina E-positivo (4).

1.1.8 Diagnosi e diagnosi differenziali

La diagnosi di certezza dei LNH prevede l'esame istologico del linfonodo o della sede extranodale coinvolti, ma comprende anche una serie di accertamenti laboratoristici e strumentali, che possono essere utili anche nel definire la prognosi.

Per la diagnosi di MCL nello specifico, è fondamentale la conferma istologica, preferibilmente tramite escissione linfonodale. Solitamente, l'analisi immunoistochimica degli antigeni delle cellule B e T e delle immunoglobuline e l'analisi citogenetica o la FISH per identificare la traslocazione t(11;14) sono sufficienti per arrivare alla diagnosi.

Nei casi ciclina D1-negativi, può, invece, essere utile la conferma dell'espressione di SOX11 a sostegno della diagnosi.

Dal momento che la presentazione clinica può assomigliare a quella della leucemia linfatica cronica o ad altre forme di linfomi indolenti, la differenziazione immunoistochimica da altre entità neoplastiche è di grande importanza.

Alcune somiglianze si possono ritrovare, infatti, con la leucemia linfatica cronica e con il linfoma linfocitico in termini di citologia, ma anche da un punto di vista strutturale i modelli nodulari di MCL possono presentare analogie con gli pseudo-follicoli delle altre due forme neoplastiche. Anche l'immunofenotipo della leucemia linfatica cronica è simile: si osserva l'espressione delle immunoglobuline IgM e IgD e degli antigeni associati ai linfociti B (CD19 e CD20) e l'espressione aberrante dell'antigene associato ai linfociti T CD5. A differenza del linfoma mantellare, però, nella leucemia linfatica cronica, si osserva l'espressione dell'antigene CD23, mentre nel linfoma mantellare si ha l'espressione di FMC7, CD79a e della proteina nucleare BCL-1.

Il modello nodulare di MCL, inoltre, presenta delle somiglianze con il linfoma follicolare e, come quest'ultimo, è positivo per CD20 e BCL-2, ma a differenza delle cellule

neoplastiche del linfoma follicolare, le cellule del linfoma mantellare mancano di centroblasti e immunoblasti e non esprimono CD10 e BCL-6.

Tuttavia, data l'alta variabilità di questi modelli, rimane cruciale l'analisi dell'overespressione della ciclina D1 e della traslocazione t(11;14) per confermare o escludere la diagnosi di linfoma mantellare (8).

Le indagini diagnostiche comprendono:

- *Indagini di laboratorio:*
 - Emocromo
 - Indagini sierologiche: LDH, acidi urici, funzione epatica, funzione renale, elettroforesi proteica.
 - Indagini opzionali: β 2-microglobulina e immunofissazione sierica
 - FACS (in >20% dei casi si ritrovano cellule neoplastiche circolanti)
 - Diagnostica liquorale (in caso di sospetto clinico): conta cellulare, citologia, immunoistochimica.
 - Sierologia HBV, HCV e HIV

- *Indagini istologiche:*
 - Biopsia escissionale linfonodale: citologia, immunoistochimica, citogenetica/FISH
 - Biopsia e aspirato osteomidollare: citologia, immunoistochimica, citogenetica/FISH

- *Imaging*
 - TC collo, torace, addome e pelvi
 - Ecografia addome
 - RMN (localizzazioni selezionate)
 - Gastrosopia o colonscopia: se clinicamente sintomatico o negli stadi precoci per le implicazioni nel trattamento.
 - TC-PET

- *Altro*
 - Clearance della creatinina

- Elettrocardiogramma ed ecografia cardiaca
- Prove di funzionalità polmonare

1.1.9 Trattamento

Il decorso clinico del linfoma mantellare è caratterizzato da tassi di risposta iniziali generalmente elevati; tuttavia, le recidive precoci sono frequenti e la maggior parte dei pazienti ha un decorso clinico aggressivo.

Il trattamento del MCL è radicalmente mutato negli anni e grazie all'avvento di importanti piattaforme terapeutiche ha visto un progressivo miglioramento dell'outcome dei pazienti. Negli ultimi anni è in atto una vera e propria rivoluzione. In particolare, l'arrivo in prima linea di terapia degli inibitori del BTK, come *ibrutinib*, è destinato a modificare radicalmente l'algoritmo terapeutico di questi pazienti (42).

Stadi localizzati

Solo il 10-15% dei pazienti presenta un sottotipo più indolente e questi sono tendenzialmente forme leucemiche e non nodali, con un Ki-67 molto basso (<10%). La maggior parte dei casi, quindi, richiede un inizio del trattamento precoce.

Nei rari casi diagnosticati in fase iniziale (stadi I-II), la terapia più appropriata prevede *immunochemioterapia abbreviata* seguita da un consolidamento con *radioterapia*. Sono state segnalate remissioni a lungo termine dopo sola radioterapia, ma al contempo in uno studio randomizzato sono state osservate frequenti recidive precoci dopo la sola radioterapia (43).

Stadi avanzati

I regimi di chemioimmunoterapia comprendono le opzioni standard di trattamento di prima linea per i pazienti con linfoma mantellare (44–46). Sebbene un sottoinsieme di pazienti con malattia indolente possa andare incontro all'osservazione, la maggior parte dei pazienti alla fine richiede terapia (47,48)

Per i pazienti giovani, in buone condizioni fisiche ed eleggibili per il trapianto uno regime di cura accettato è la chemioterapia di induzione, che incorpora *citarabina* e *rituximab* seguiti dal consolidamento con un trapianto autologo di cellule staminali e dal mantenimento con *rituximab* [44-46]. Per i pazienti più anziani o quelli non eleggibili per il trapianto, i regimi di chemioimmunoterapia come *bendamustina/rituximab* sono riconosciuti come approcci standard oltre a R-CHOP (*rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, prednisone*) e VR-CAP (*bortezomib, rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, prednisone*) (44,49–51).

Negli ultimi anni, i progressi nella comprensione della biologia del linfoma mantellare e nello sviluppo dei farmaci hanno portato a esaminare paradigmi di trattamento privi di chemioterapia. Gli agenti mirati, tra cui gli inibitori di cBTK *ibrutinib*, *acalabrutinib* e *zanubrutinib*, hanno mostrato un'attività clinica senza precedenti nei pazienti con malattia recidivante/refrattaria e sono ora opzioni di seconda linea per i pazienti che seguono la chemioimmunoterapia (52–56). Inoltre, l'incorporazione precoce di *ibrutinib* è associata a tassi di risposta, durata della risposta e sopravvivenza migliorati, suggerendo che un'attività clinica ancora maggiore potrebbe essere osservata nei pazienti *naïve* al trattamento (57).

Trattamento di prima linea nel paziente con età <65 anni nell'era pre-TRIANGLE

Nei pazienti giovani (<65 anni) l'attuale standard di cura prevede un'intensificazione di dose attraverso un'induzione con immunochemioterapia seguita da un regime di consolidamento ad alte dosi e da un trapianto di cellule staminali autologhe (ASCT), seguito da mantenimento con *rituximab*. In diversi casi, infatti, questo tipo di trattamento ha portato a un miglioramento dei tassi di sopravvivenza. Tuttavia, tale schema è stato recentemente modificato grazie ai risultati dello studio clinico TRIANGLE. Il TRIANGLE è uno studio clinico, di fase III, randomizzato che prevede il confronto tra il trattamento standard e l'implementazione dello stesso con l'aggiunta del farmaco inibitore della BTK, *ibrutinib*. Lo studio ha dimostrato nella sua analisi preliminare risultati sorprendenti: l'aggiunta di *ibrutinib* durante l'induzione e come mantenimento con o senza ASCT ha dimostrato una forte efficacia con una tossicità accettabile. Questi risultati sono destinati a modificare radicalmente il trattamento del MCL nella prima linea (42).

Lo standard terapeutico, nell'era pre-TRIANGLE, quindi, prevedeva:

- *Induzione*: sono stati ottenuti risultati promettenti con l'utilizzo sequenziale di 4 cicli di R-CHOP, seguiti da 4 cicli di R-DHAP (ovvero *rituximab*, *dexametasone*, *citarabina* ad alte dosi e *cisplatino*) (58). Un importante studio randomizzato europeo ha comparato l'utilizzo di R-CHOP/DHAP rispetto all'utilizzo di sola R-CHOP prima del consolidamento con trapianto di cellule staminali autologhe, mostrando un TTF (time-to-treatment failure, tempo al fallimento del trattamento) raddoppiato (59). Similmente, il trattamento con R-hyper-CVAD (ovvero *rituximab*, *ciclofosfamida iperfrazionata*, *vincristina*, *doxorubicina* e *dexametasone*) ha permesso di raggiungere alti tassi di risposta completa e remissioni a lungo termine (60); tuttavia, rimane poco utilizzato per la significativa tossicità.

- *Condizionamento e ASCT*: prevede una radio-chemioterapia mieloablattiva seguita dal trapianto di cellule staminali autologhe (ASCT) (58,59). Un importante studio randomizzato ha dimostrato un significativo miglioramento di PFS (3.3 vs 1.5 anni) e dell'OS (61), indipendentemente dall'aggiunta di *rituximab*. Si è visto, inoltre, che l'irradiazione totale del corpo (TBI) determina vantaggi nel momento in cui viene eseguita ad alte dosi e in pazienti in remissione parziale dopo l'induzione, mentre a dosaggio convenzionale non determina benefici.

Purtroppo, anche dopo regimi di consolidamento così intensivi, si possono osservare ricadute nella maggior parte dei pazienti. Un ulteriore miglioramento della sopravvivenza a lungo termine si è ottenuta con la “purificazione in vivo”, tramite la somministrazione di un regime di consolidamento contenente *rituximab* prima dell'aferesi.

- *Mantenimento*: prevede l'utilizzo del *rituximab* dopo ASCT, infatti un ampio studio di fase 3 ha dimostrato un significativo miglioramento della PFS (83% vs 64% dopo 4 anni) e dell'OS (89% vs 80% dopo 4 anni) (45). Successivamente il protocollo MCL0208, che verrà illustrato nel prossimo capitolo e oggetto del follow up di questa tesi, ha dimostrato che l'utilizzo della *lenalidomide* dopo ASCT porta a un netto miglioramento della PFS (80% vs 64% dopo 3 anni) (62).

Come si modificherà il trattamento di prima linea nel paziente con età < 65 anni nell'era dello studio TRIANGLE

Nel 2016, la Rete Europea MCL ha avviato lo studio TRIANGLE, randomizzato, in aperto e con 3 bracci, per valutare l'aggiunta di *ibrutinib* al trattamento standard (braccio A+I) rispetto al precedente trattamento standard (braccio A) e a un trattamento contenente *ibrutinib* senza ASCT (braccio I) (63).

I pazienti con MCL in stadio avanzato II-IV non trattati precedentemente, fino a 65 anni e idonei per *citarabina* ad alta dose e ASCT sono stati randomizzati 1:1:1 nei 3 bracci dello studio A, A+I e I. Il trattamento consisteva in 3 cicli di R-CHOP/R-DHAP senza (braccio A) o con aggiunta di *ibrutinib* ai cicli di R-CHOP e 2 anni di mantenimento (bracci A+I, I). L'ASCT era previsto per i pazienti responsivi dei bracci A e A+I. Il mantenimento con *rituximab* poteva essere applicato secondo le linee guida nazionali in tutti i pazienti responsivi, indipendentemente dal braccio dello studio. Per il risultato primario, la sopravvivenza senza

fallimento (FFS), la malattia stabile alla fine dell'induzione, qualsiasi progressione o decesso sono stati considerati eventi (63).

Tra luglio 2016 e dicembre 2020, 870 pazienti sono stati randomizzati in A (n=288), A+I (n=292) e I (n=290). L'età mediana era di 57 anni, il 76% dei pazienti erano maschi, l'87% era in stadio IV e il 58%/27%/15% aveva un rischio basso/intermedio/alto MIPI. I tassi di OR e CR erano del 94% e del 36% dei 272 pazienti valutabili nel braccio A (R-CHOP/R-DHAP) rispetto al 98% e al 45% dei 559 pazienti valutabili nei bracci combinati A+I/I (*ibrutinib*-R-CHOP/R-DHAP). Dopo un follow-up mediano di 31 mesi, A non è riuscito a mostrare superiorità su I in termini di FFS con una FFS a 3 anni del 72% (A) rispetto all'86%, A+I era superiore a A in termini di FFS con una FFS a 3 anni dell'88% (A+I) rispetto al 72%. Il monitoraggio statistico per il confronto di FFS di A+I rispetto a I è ancora in corso. Non ci sono state differenze sostanziali nell'insorgenza di eventi avversi di grado 3-5 durante l'induzione con R-CHOP/R-DHAP rispetto a *ibrutinib*-R-CHOP/R-DHAP. Quindi, l'aggiunta di *ibrutinib* durante l'induzione e come mantenimento con o senza ASCT ha mostrato una forte efficacia con tossicità accettabile. È stato chiaramente dimostrato che il regime corrente ad alta dose non è superiore al nuovo regime contenente *ibrutinib* senza ASCT, ma sarà necessario un ulteriore follow-up per chiarire il ruolo dell'ASCT nel contesto del trattamento contenente *ibrutinib*. Tuttavia, i risultati attuali già supportano l'uso di *ibrutinib* nel trattamento di prima linea dei pazienti più giovani con MCL (64).

Trattamento di prima linea nel paziente con età >65 anni

I pazienti anziani non idonei al trapianto sono un gruppo molto eterogeneo per quanto riguarda le prestazioni fisiche e cognitive e questo deve essere tenuto in considerazione nella scelta del trattamento:

- *Induzione:*

- Pazienti over 65 fit: ricevono l'immunochemioterapia convenzionale seguita da un mantenimento con *rituximab* (65). La combinazione VR-CAP (ovvero *bortezomib*, *rituximab*, *ciclofosfamide*, *doxorubicina* e *prednisone*) rappresenta la terapia di induzione standard per questo gruppo di pazienti. Tuttavia, la tossicità ematologica (in particolare, trombocitopenia di grado 3) che si ha in seguito all'utilizzo di VR-CAP si è dimostrata essere maggiore rispetto all'utilizzo di R-CHOP (51). Un'alternativa possibile, da tenere in considerazione solo per pazienti anziani molto fit con un alto rischio di

progressione per la severa tossicità ematologica, prevede il regime R-BAC (ovvero *rituximab*, *bendamustina* e *citarabina*) (66).

- Pazienti over 65 non fit: per i pazienti che non sono adatti a regimi intensivi di chemioterapia, un'alternativa valida è la terapia con R-bendamustina, che ha dimostrato risposte simili all'utilizzo di R-CHOP in termini di OS e PFS, ma con un miglior profilo di tossicità (49).

Insieme, VR-CAP e R-bendamustina rappresentano gli approcci standard nei pazienti più anziani, che sono la maggior parte dei pazienti con MCL. In linea di massima, BR si utilizza prevalentemente in pazienti con forme più indolenti o per pazienti che non si qualificano per regimi più aggressivi, mentre VR-CAP sembra essere appropriato nelle forme più aggressive (59).

- *Mantenimento*: un ampio studio randomizzato Europeo di fase 3 ha dimostrato che il mantenimento con rituximab porta a valori di PFS (51% vs 22%) e OS (79% vs 59%) nettamente superiori rispetto al mantenimento con interferone (51); quindi, attualmente è raccomandato il mantenimento con *rituximab*.

Anche nella prima linea del MCL elderly sono state testate schedule di associazione con farmaci inibitori della BTK (*Shine study*). Tuttavia, i risultati sono risultati immaturi e non pienamente soddisfacenti da modificare lo standard precedente.

Trattamento nelle forme ricorrenti e refrattarie

Negli ultimi dieci anni si è osservato un significativo miglioramento nella gestione dei pazienti affetti da MCL, con un sostanziale miglioramento della PFS dopo il trattamento di prima linea e dell'OS (67,68). Nonostante questi successi, la ricaduta è ancora la regola, e il trattamento della malattia ricorrente/refrattaria (R/R) è ancora un bisogno clinico non soddisfatto.

Il ruolo delle strategie di chemioterapia nel contesto R/R è limitato e le prove di efficacia sono scarse ad eccezione dei regimi che combinano *bendamustina* e *citarabina* che sembrano avere un'azione sinergica nel MCL e si sono dimostrati efficaci anche in questa popolazione (69,70). D'altra parte, diversi nuovi agenti, tra cui farmaci mirati come *ibrutinib* e *venetoclax*, nuovi anticorpi monoclonali e terapie cellulari si sono dimostrati efficaci nel trattamento del MCL R/R e promettono un impatto sostanziale sulla gestione di questi soggetti (71,72).

Quindi, la malattia nei pazienti con forme ricorrenti/refrattarie tende ad avere un decorso più aggressivo e si associa ad una resistenza maggiore alle dosi convenzionali di chemioterapia. Infatti, l'immunochemioterapia convenzionale, che determina una buona risposta nel trattamento di prima linea, porta nelle forme ricorrenti a risposte di breve durata (73,74).

- *Immunochemioterapia*

Combinazioni di chemioterapia standard, quali R-ICE (*rituximab, ifosfamide, carboplatino, etoposide*), R-DHAP (*rituximab, desametasone, citarabina ad alte dosi e cisplatino*), R-HyperCVAD (*rituximab, ciclofosfamide iperfrazionata, vincristina, doxorubicina e desametasone*, alternati con *metotrexato ad alte dosi e citarabina*). Questi trattamenti vengono generalmente utilizzati nel corso della prima linea di trattamento, ma danno risultati poco soddisfacenti nella malattia recidiva/refrattaria (26).

Un programma efficace nella malattia recidivata/refrattaria è l'R-BAC (*rituximab, bendamustina, citarabina*). Questo regime di terapia ha dimostrato notevole efficacia e tollerabilità in studi clinici recenti, ma una durata della risposta subottimale (70).

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche allogenico risulta gravato da un elevato tasso di morbilità e mortalità ed è limitato a pazienti giovani (< 65 anni), sensibili alla chemioterapia dopo la terapia iniziale e senza significative comorbidità (61).

- *BTK inibitori*

Diverse evidenze scientifiche hanno dimostrato il ruolo della via di segnale del B-cell receptor (BCR) per la sopravvivenza e la crescita delle cellule B maligne nei linfomi. La tirosina chinasi di Bruton (BTK) è stata riconosciuta come un componente principale della via del segnale del recettore del BCR. Ciò ha portato allo sviluppo di una nuova classe di farmaci chiamati inibitori della BTK che si sono dimostrati un grande avanzamento in diversi tumori B linfoidi maturi (52).

In uno studio di fase 2, *ibrutinib*, il primo inibitore della BTK della sua classe, ha mostrato un tasso di risposta obiettiva del 68% nei pazienti con MCL R/R che avevano precedentemente ricevuto una mediana di tre terapie precedenti (75). *Ibrutinib* ha anche dimostrato un profilo di sicurezza favorevole nel MCL R/R. La maggior parte degli eventi avversi segnalati erano di grado 1 o 2 e si sono verificati in più del 20% dei pazienti: diarrea (50% dei pazienti), affaticamento (41%), nausea (31%), edema periferico (28%), dispnea (27%), stitichezza (25%), infezione delle vie respiratorie superiori (23%), vomito (23%) e diminuzione dell'appetito (21%) (75). Gli eventi avversi ematologici di grado 3 e 4 includevano

neutropenia (16% dei pazienti), trombocitopenia (11%) e anemia (10%) (75). Nell'analisi a lungo termine, *ibrutinib* ha confermato questi risultati (52).

In un ulteriore studio di fase 2, pazienti anziani non trattati in precedenza (>65 anni) con MCL sono stati arruolati per ricevere *ibrutinib* in combinazione con *rituximab* (IR) fino alla progressione o alla discontinuazione per qualsiasi motivo. Il tasso di risposta oggettiva è stato del 95% (69% CR, 26% PR, 5% malattia stabile) con un alto tasso di negatività MRD (per citofluorimetria 65%). La mediana della PFS e della OS non è stata raggiunta (76). La maggior parte degli eventi avversi osservati erano di grado 1 o 2, inclusi. Gli eventi avversi ematologici di grado 3 e 4 includevano neutropenia (16% dei pazienti), trombocitopenia (11%) e anemia (10%). Gli eventi emorragici di grado 3 sono avvenuti in cinque pazienti, e non sono stati registrati eventi emorragici di grado 4 o 5 (76). *Ibrutinib* si è dimostrato altamente efficace, ma non privo di tossicità. In un'analisi dei dati reali, gli eventi avversi sono stati la causa più comune della discontinuazione del farmaco; tra questi, la fibrillazione atriale, le complicanze infettive e le citopenie sono state le cause più comunemente descritte (77).

In questo senso, sono stati sviluppati inibitori di seconda generazione della BTK con l'obiettivo di ridurre gli effetti non specifici, al fine di migliorare l'efficacia e ridurre la tossicità. Ad oggi, gli inibitori di seconda generazione *acalabrutinib* e *zanubrutinib* hanno dimostrato almeno un'efficacia comparabile e un profilo di tossicità più favorevole (53,78). Sulla base di questi risultati, *acalabrutinib* e *zanubrutinib* hanno ricevuto l'approvazione FDA per i pazienti con MCL R/R.

Recentemente, è stato approvato da EMA l'inibitore non covalente di BTK *pirtobrutinib* in pazienti precedentemente trattati con un inibitore della BTK classico o covalente. La ricaduta si verifica attraverso l'evoluzione dei meccanismi di resistenza o lo sviluppo di intolleranza ai cBTKi. *Pirtobrutinib*, un inibitore altamente selettivo e non covalente (reversibile) di BTK, ha una farmacologia orale favorevole che consente un'inibizione continua di BTK per tutto l'intervallo di dosaggio giornaliero, indipendentemente dal tasso intrinseco di turnover di BTK. Inoltre, è il primo BTKi a dimostrare un'efficacia duratura dopo una precedente terapia con cBTKi in pazienti fortemente trattati per il MCL R/R ed è stato ben tollerato con una bassa frequenza di interruzione del trattamento dovuta alla tossicità (79). *Pirtobrutinib* è approvato dalla FDA e dall'EMA per trattare il MCL R/R dopo almeno due linee di terapia sistemica, compreso un precedente cBTKi.

I risultati aggiornati dello studio BRUIN sono stati recentemente presentati in tutti i pazienti, inclusi quelli con MCL R/R ad alto rischio biologico. Tra tutti i 152 pazienti con MCL R/R, che hanno ricevuto un precedente cBTKi, il tasso di risposta obiettiva (ORR) è stato del 49,3% (IC al 95%, 41,1-57,6). Nella coorte di MCL (n=166), gli eventi avversi emergenti dal trattamento (TEAEs) più frequenti sono stati affaticamento (31,9%), diarrea (22,3%), e dispnea (17,5%). Complessivamente, 8 pazienti (5%) hanno avuto eventi avversi correlati al trattamento che hanno portato a riduzioni di dose e 5 (3%) hanno avuto eventi avversi correlati al trattamento che hanno portato alla sospensione di *pirtobrutinib* (80). Questi risultati confermano un'attività sostanziale nel MCL R/R con cBTKi, dimostrando che *pirtobrutinib* non è curativo, come dimostrato dal continuo modello di ricaduta. È stato dimostrato che il fallimento dei BTKi ha un esito ridotto quando il farmaco è applicato nelle fasi di trattamento successive (81), mentre questo è meno evidente quando viene utilizzato precocemente nel corso della malattia e diversi studi clinici stanno indagando sull'impatto potenziale del trattamento con BTKi nell'ambito del trattamento di prima linea (82).

Un rapporto su 370 pazienti con MCL R/R trattati con *ibrutinib* in tre studi (fase II PCYC-1104 e SPARK, fase III RAY) estesi a un follow-up di 3,5 anni, ha mostrato miglioramenti nella seconda linea rispetto alle linee successive, con una mediana di PFS-2 di 25,4 mesi e OS-2 non raggiunta (82). Recentemente, altri studi retrospettivi hanno confermato questi dati, evidenziando lo scarso esito per i pazienti che hanno avuto un fallimento nel trattamento con *ibrutinib* (83,84).

Inoltre, sono in corso diversi studi clinici sia come agente singolo che in combinazione con chemioterapia e i risultati sono in attesa. Naturalmente, poiché i BTKi vengono spostati in prima linea, sono necessarie nuove strategie per sviluppare approcci efficaci e applicabili per i pazienti che sperimentano un fallimento dei BTKi precocemente nel corso della loro malattia.

- *Immunomodulanti*

Gli immunomodulatori sono un altro importante approccio terapeutico target. Diversi studi hanno evidenziato i benefici della *lenalidomide* e l'utilizzo combinato di agenti come la *lenalidomide* e il *rituximab* potrebbe rappresentare una strategia terapeutica efficace per il trattamento del linfoma mantellare, soprattutto nei pazienti a basso rischio, con potenziali benefici a lungo termine (60).

- *Novel strategies*

Il *venetoclax* è un agente orale mimetico del BH3 che inibisce direttamente BCL2 inducendo apoptosi nelle cellule maligne quando BCL2 è sovraespresso. In uno studio di fase I, il *venetoclax* ha mostrato la massima attività come agente singolo contro il linfoma mantellare con un tasso di risposta complessiva migliore del 75% e un tasso di risposta completa del 21%, con una sopravvivenza libera da progressione mediana di 14 mesi (75). Nonostante questi ottimi risultati, la ricaduta è la regola e sono necessarie nuove strategie.

I modelli preclinici indicano che l'inibizione duale di BTK e BCL2 è sinergica. In uno studio recente, il targeting duale di BTK e BCL2 con *ibrutinib* e *venetoclax* ha migliorato gli esiti nei pazienti con MCL R/R mostrando un alto tasso di negatività per la MRD (67% mediante citofluorimetria e 38% mediante ASO-PCR). Dopo un follow-up mediano di 15,9 mesi, la sopravvivenza libera da progressione non è stata raggiunta, con tassi stimati di sopravvivenza libera da progressione del 75% (IC al 95%, 60-94) a 12 mesi e del 57% (IC al 95%, 40-82) a 18 mesi (85). Considerando il numero ridotto di pazienti arruolati in questo studio, saranno necessari futuri trial per confermare questa scoperta.

Il *KTE-X19*, una terapia con cellule T anti-CD19 a recettore antigenico chimerico (CAR), ha indotto alti tassi di risposta nei pazienti con MCL R/R, portando all'approvazione della FDA. In uno studio multicentrico di fase 2, sono stati arruolati 74 pazienti pesantemente trattati (fino a cinque terapie precedenti, tutti i pazienti avevano ricevuto BTKi), con un tasso di risposta obiettiva dell'85% e un tasso di risposta completa del 59%. A 12 mesi, la sopravvivenza libera da progressione stimata e la sopravvivenza complessiva erano rispettivamente del 61% e dell'83%. La sindrome da rilascio di citochine di grado 3 o superiore e gli eventi neurologici sono stati riscontrati rispettivamente nel 15% e nel 31% dei pazienti (72).

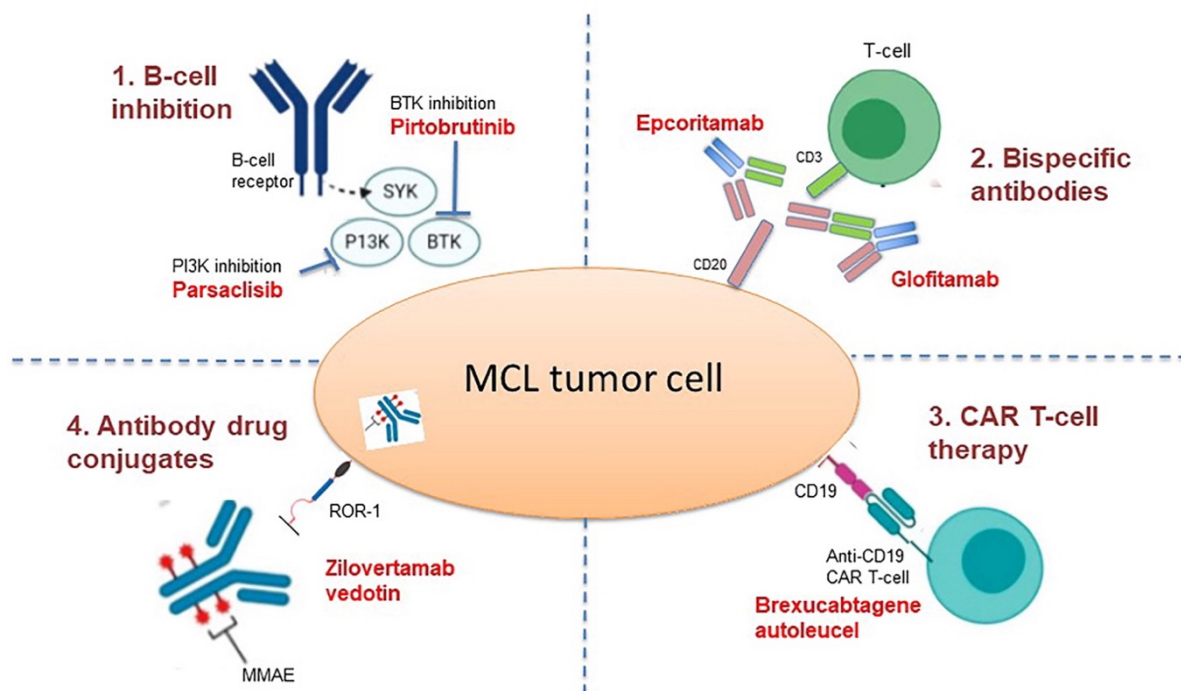
Anche se questi risultati sembrano eccellenti, il follow-up a lungo termine non è ancora disponibile e quindi non ci sono ancora dati sulla durata delle risposte ottenute con il trattamento CAR-T. Inoltre, la terapia CAR-T è costosa, laboriosa e non ampiamente disponibile in diversi contesti clinici e non adatta a diverse popolazioni cliniche, compresi i pazienti con MCL non idonei/anziani.

Gli anticorpi bispecifici sono una promettente classe di farmaci nel trattamento di diversi tipi di tumori, compreso il linfoma mantellare. Questi farmaci sono progettati per

riconoscere e attaccare due bersagli diversi, come due proteine presenti sulla superficie delle cellule tumorali o una proteina tumorale e una cellula del sistema immunitario (4).

Alcuni anticorpi bispecifici, in particolare diretti contro CD20 e CD3, sono in fase di sviluppo per il trattamento delle neoplasie delle cellule B. I dati di sicurezza ed efficacia riportati nei piccoli numeri di pazienti con linfoma mantellare nei trial di fase iniziale per questi agenti sono incoraggianti (86–90). Tra questi si identificano *glofitamab*, un anticorpo bispecifico intravenoso, che si lega a CD20/CD3 e attiva le cellule T (86) e *epcoritamab*, un anticorpo bispecifico CD20/CD3 somministrato per via sottocutanea, fino alla progressione della malattia o alla tossicità inaccettabile; per i pazienti con linfoma mantellare, il tasso di risposta obiettiva è stato del 50% (due pazienti), con una remissione completa nel 25% (un paziente) (89).

FIGURA 4: nuove strategie terapeutiche



[Fonte: Kumar A, Eyre TA, Lewis KL, Thompson MC, Cheah CY. New Directions for Mantle Cell Lymphoma in 2022. Am Soc Clin Oncol Educ Book. 2022]

Infine, tra i coniugati anticorpo-farmaco, lo *zilovertamab vedotin* si lega specificamente al recettore tirosina chinasi-simile orfano-1 (ROR-1), un oncoproteina espressa patologicamente nel linfoma mantellare e in altre neoplasie. I risultati della fase I di dose escalation riportano una sicurezza ed efficacia promettenti in 15 pazienti con linfoma mantellare (tasso di risposta obiettiva, 47%; sette pazienti; remissione completa in tre pazienti) (91).

Gli eventi avversi più frequentemente osservati sono stati neutropenia e neuropatia periferica. Questi dati preliminari suggeriscono che ROR-1 ha promessa come bersaglio terapeutico nel linfoma mantellare (91).

1.2 Nuovi predittori di risposta al trattamento: MRD

Nel corso del tempo sono stati individuati diversi predittori clinici, istologici e biologici fondamentali, tra cui il MIPI, l'indice di proliferazione, l'istologia blastoide e le mutazioni TP53 e KMT2D (92). Negli ultimi anni, la rilevazione della malattia residua minima (MRD) ha suscitato un notevole interesse come indicatore prognostico dopo il trattamento. Non esiste una singola tecnica per la rilevazione della MDR; tuttavia, attualmente, la real-time PCR quantitativa (RQ-PCR) è considerata il gold standard sia per il linfoma mantellare, sia anche per il linfoma follicolare (93,94).

1.2.1 Metodologie

Tra i diversi approcci per la rilevazione, quelli maggiormente utilizzati comprendono la citometria a flusso (FC) e gli strumenti basati sulla biologia molecolare, sia quelli basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR), sia gli approcci più recenti basati sul sequenziamento di nuova generazione (HTS) (95–98).

Citofluorimetria

La citofluorimetria si basa sulla valutazione delle anomalie immunofenotipiche e sull'individuazione della restrizione delle catene leggere delle immunoglobuline, cruciale per identificare la clonalità tra le popolazioni di cellule B. Questo metodo risulta più rapido e accessibile rispetto alle tecniche di PCR o sequenziamento, ma, purtroppo, nel linfoma mantellare non esistono pannelli validati per la rilevazione della MRD che siano standardizzati a livello multi-laboratorio, soprattutto a causa dell'alta eterogeneità immunofenotipica della malattia, che richiede combinazioni di marcatori più ampie per una rilevazione altamente sensibile della MRD (99,100). Tuttavia, importanti studi hanno dimostrato che la citofluorimetria può rilevare la malattia nel sangue periferico o nel midollo osseo in oltre l'85% dei pazienti con MCL in stadio II-IV alla diagnosi (65,101). Sebbene la sensibilità della citofluorimetria nel rilevare la MRD nel MCL sia comparabile a quella della PCR nello stadio iniziale della malattia, risulta meno sensibile nel monitoraggio post-trattamento, con una percentuale di campioni positivi tramite PCR e negativi tramite citofluorimetria (100).

Strategie ottimizzate di citofluorimetria multiparametrica (MFC) hanno una migliore sensibilità e specificità nella rilevazione della MRD (102).

RQ-PCR

I metodi basati sulla PCR quantitativa sono il gold standard per la rilevazione della MRD perché sono sensibili, standardizzati e validati in ampi trial multicentrici; questi metodi valutano la persistenza delle cellule tumorali residue amplificando il genotipo del linfoma (103,104). Nei linfomi ci sono due tipi di segnali genetici distintivi che possono essere utilizzati per la rilevazione della MRD: le traslocazioni specifiche del tumore e i riarrangiamenti del recettore dell'antigene.

Il marcatore più utilizzato per gli studi di MRD nei linfomi è il riarrangiamento del gene della catena pesante dell'immunoglobulina (IGH), che è rilevabile in oltre l'80-95% delle neoplasie delle cellule B. Le strategie di PCR di consenso, che utilizzano primer di consenso per le regioni VH e JH, hanno un limite di rilevazione dell'1-2% di cellule linfomatose in uno sfondo policlonale e sono quindi limitate nella loro idoneità per la rilevazione della MRD. Il sequenziamento della regione giunzionale dei geni IGH riarrangiati consente l'identificazione del riarrangiamento VH-DH-JH specifico del tumore e, conseguentemente, la progettazione di primer allele-specifici (ASO) per un approccio in RQ-PCR. Nel MCL i riarrangiamenti clonali di IGHV sono rilevabili in più del 90% dei pazienti affetti da MCL e sono quindi il bersaglio più frequentemente utilizzato per la MRD (105).

Le traslocazioni cromosomiche strutturali sono caratteristiche dei sottotipi istologici delle neoplasie linfoidi mature, come t(14;18) nel linfoma follicolare e t(11;14) nel MCL, possono anche servire come bersagli PCR per la valutazione della clonalità e la rilevazione della MRD. Nel linfoma mantellare la caratteristica traslocazione cromosomica t(11;14) coinvolge una regione di 360 kb a monte del gene della ciclina D1 (CCND1); in quasi il 35% di questi casi, i punti di rottura sul cromosoma 11 si concentrano all'interno di una regione di 85 pb nota come regione di cluster di traslocazione maggiore (BCL1-MTC) (106).

Nonostante le traslocazioni cromosomiche siano presenti nella grande maggioranza dei pazienti affetti da MCL e rilevabili tramite FISH, i punti di rottura nella regione BCL1-MTC si distribuiscono fino a 2 kb a valle della regione MTC, risultando nella rilevazione tramite PCR di traslocazioni t(11;14) solo nel 35% dei casi. Recentemente, l'applicazione della metodologia di Amplificazione del Locus Bersaglio (TLA) si è dimostrata in grado di identificare un bersaglio MRD adatto derivato dalla t(11;14) in quasi l'80% dei pazienti (106,107).

I principali avanzamenti tecnici nella rilevazione della MRD nei tumori linfoidi sono stati lo sviluppo e la standardizzazione degli strumenti di RQ-PCR (108,109). Utilizzando primer ASO per il riarrangiamento di IGH o per la t(11;14), la PCR raggiunge limiti di rilevazione riproducibili, individuando anche una singola cellula MCL su fino a 100.000 cellule (110). Ulteriori miglioramenti della RQ-PCR sono stati ottenuti grazie agli sforzi di standardizzazione multi-laboratorio, garantendo un'elevata riproducibilità tra i diversi laboratori di MRD.

Negli ultimi anni, la PCR digitale a gocce (ddPCR) ha permesso di ottenere una maggiore capacità di quantificazione, superando i casi classificati come "positivi non quantificabili" dalla RQ-PCR (111). Tuttavia, la ddPCR deve ancora dimostrare la sua efficacia predittiva nei confronti della RQ-PCR (112).

NGS

Le nuove metodologie si basano sul sequenziamento ad alto rendimento (HTS) del riarrangiamento clonale di IGHV, evitando le fasi di laboratorio che richiedono tempo per la progettazione e la verifica di saggi specifici per il paziente, risultando anche più specifiche della RQ-PCR (95,96). Il primo passo consiste in una PCR multiplex per l'amplificazione dei riarrangiamenti VDJ dei geni IG o TR, seguita da una seconda PCR e sequenziamento ad alto rendimento (95,113).

Un aspetto importante è la corretta quantificazione di MRD, in particolare nella situazione di basso numero di cellule B policlonali. La quantificazione di MRD, infatti, è soggetta a errori, poiché la PCR multiplex IG/TR amplifica solo i geni IG/TR riarrangiati; di conseguenza, le cellule con il rispettivo gene in configurazione germinale non vengono considerate. Questo potrebbe portare a falsi risultati errati, pertanto, è necessario includere controlli interni standardizzati in ogni reazione di sequenziamento per una corretta quantificazione di MRD (98,114).

In conclusione, procedure convalidate, esecuzione standardizzata, controlli di qualità regolari e linee guida per l'interpretazione dei risultati sono condizioni necessarie per il trattamento diretto di MRD nelle neoplasie linfoidi. L'aspetto più importante di qualsiasi valutazione di MRD richiederà un test rapido, affidabile e ripetibile abbastanza sensibile da rilevare la malattia prima della ricaduta clinica; l'HTS offre promesse notevoli in questo senso, ma è ancora necessaria un'ampia standardizzazione e convalida clinica (115).

1.2.2 Studi

La determinazione della MRD sta emergendo come un metodo sicuro e pratico per prevedere il rischio di fallimento terapeutico, come documentato in diversi studi indipendenti. Alcuni degli studi precedenti si basavano sulla nested-PCR, mentre gli studi più recenti impiegavano principalmente la RQ-PCR (116–118); solo uno studio ha affrontato entrambi sistematicamente, indicando un migliore valore predittivo della RQ-PCR nella maggior parte dei punti temporali (119).

Inoltre, sono stati indagati sia il sangue periferico (PB) che il midollo osseo (BM). Entrambi si sono rivelati generalmente informativi, ma risultati contraddittori su quale fonte sia più predittiva sono emersi da diversi studi e il confronto diretto è attualmente difficile. Alla diagnosi, l'infiltrazione tumorale è comparabile in BM e PB, ma si è osservato che durante e dopo il trattamento la rimozione del tumore è più rapida in PB rispetto a BM. D'altra parte, il PB è chiaramente una fonte più accessibile rispetto a BM (120–123). Alcuni risultati preliminari indicano che anche il DNA cell-free potrebbe rappresentare una fonte di tessuto informativa per la rilevazione della MRD (124). Attualmente non esiste un consenso ben definito su quale sia la fonte più informativa da indagare e la maggior parte degli studi in corso include il test di entrambe le fonti almeno negli stessi punti temporali.

Dal momento che l'MRD è un forte e indipendente predittore dell'esito e potrebbe fornire uno strumento affidabile per adattare il trattamento in base alla presenza di carico tumorale residuo e alla cinetica della malattia, sono stati eseguiti diversi studi che hanno permesso di ottenere informazioni importanti a questo proposito.

Negli studi europei su pazienti giovani ed anziani con MCL, dove è stata utilizzata l'immunochemioterapia combinata con o senza trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) nei pazienti più giovani e il mantenimento con anti-CD20 nei pazienti non idonei al trapianto, è stato possibile ottenere tassi di risposta rilevanti della MRD del 40% dopo il trattamento con R-CHOP (119).

L'uso di *rituximab* combinato con chemioterapia ad alta dose con Ara-C rappresenta un approccio di induzione molto efficace per ridurre il carico tumorale. L'intensificazione con citarabina ad alta dose (HA) e *rituximab* ha mostrato tassi di risposta della MRD senza precedenti, diventando un nuovo obiettivo per i pazienti più giovani e in buona condizione fisica (46,101,120,125–127).

Nell'MCL, l'impatto della chemioterapia ad alte dosi e del successivo trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) ha migliorato la risposta clinica e la sopravvivenza a lungo termine

ed è attualmente lo standard di cura nei pazienti più giovani (61,128). Negli studi europei sull'MCL, l'ASCT aumenta i tassi di remissione molecolare dopo il trattamento con R-CHOP dal 47% al 68% nel PB e dal 26% al 59% nel BM (126). Nello studio MCL3 nordico, l'ASCT ha aumentato la percentuale di pazienti negativi alla MRD nel PB e/o BM dal 53% dopo il trattamento alternato R-CHOP/R-HA all'83% (125). In un'analisi intermedia dello studio LYSA-LYMA, l'ASCT ha aumentato i tassi di negatività alla MRD tra i pazienti in remissione clinica dopo 4 cicli di R-DHAP dall'80% al 95% nel PB e dal 66% all'82% nel BM (121).

L'efficienza del trattamento di induzione prima di ASCT conserva anche la sua influenza sulla prognosi, che può essere valutata dallo stato di MRD prima di ASCT (121). Nello studio LYMA di LYSA e nello studio italiano MCL0208, alcuni punti di riferimento pre-ASCT e tutti i punti di riferimento post-ASCT sono stati altamente predittivi dell'esito (121,125).

Il follow-up a lungo termine dei pazienti in remissione clinica mediante MRD è di importanza clinica, poiché la ricomparsa di MRD in remissione clinica è associata alla ricaduta clinica (119,125,126). Lo stato di MRD post-ASCT è altamente prognostico per la PFS ed è indipendente dal punteggio MIPI, dall'indice Ki-67, dallo stato CT-ASCT e dallo stato PET pre-ASCT. Nel trial MCL0208, la positività di MRD è stata associata a un rischio più elevato di ricaduta o morte e la presenza di almeno due risultati consecutivi negativi di MRD ha conferito un rischio significativamente ridotto di ricaduta (119).

Per il controllo a lungo termine della malattia sono importanti sia il raggiungimento della risposta MRD, sia il suo mantenimento. Il ruolo della terapia di mantenimento dopo regimi di induzione per prevenire la ricaduta della malattia è oggetto di dibattito (123,129–132). Lo studio Lyma 101, a questo proposito, ha valutato l'utilizzo di *obinutuzumab* in associazione con DHAP (O-DHAP) seguito da ASCT e manutenzione con *obinutuzumab* individuando un'alta percentuale di risposta MRD nei pazienti non trattati con MCL. Lo scopo è quello di indagare il ruolo della manutenzione guidata da MRD in questa popolazione (132).

Dal momento che la positività di MRD, anche a livelli bassi, predice una ricaduta clinica imminente, questo approccio può portare alla personalizzazione del trattamento, con l'obiettivo di prevenire o ritardare la progressione chiara della malattia. In diversi rapporti prospettici e retrospettivi, un trattamento preventivo con rituximab dei pazienti MRD positivi è stato in grado di riportarli alla negatività di MRD, con la possibilità di prolungare la loro PFS. In una serie retrospettiva di pazienti italiani con FL e MCL dopo ASCT, 18 pazienti con ricomparsa di MRD o persistenza di MRD hanno ricevuto 4 corsi di rituximab e 2 infusioni aggiuntive di rituximab in caso di persistente positività PCR, inducendo la negatività di MRD e una risposta clinica stabile (133,134).

Negli ultimi decenni sono stati valutati diversi nuovi farmaci per il panorama terapeutico dell'MCL, tra cui la *lenalidomide*. Anche quando somministrata al di fuori di un trattamento chemioterapico, la *lenalidomide* in associazione con *rituximab* è stata in grado di indurre 8 risposte molecolari in una serie molto piccola di 10 pazienti (135,136). Quando combinata con *bendamustina*, la *lenalidomide* ha indotto un numero significativo di risposte molecolari, sia quando usato inizialmente che in caso di ricaduta (131). Il trial FIL MCL0208, di cui questa Tesi tratta il follow-up, ha testato il valore nel mantenimento con *lenalidomide*.

Altri nuovi farmaci attivi nell'MCL includono inibitori di BTK e antagonisti di Bcl-2 (52,85,135). I dati sulla valutazione di MRD sono ancora limitati; il trial TRIANGLE, uno studio randomizzato a tre bracci parallelo internazionale, in fase 3, mira a indagare se l'aggiunta di *ibrutinib* al trattamento standard attuale potrebbe migliorare gli esiti. Questo studio includerà la rilevazione di MRD e consentirà quindi di stabilire l'impatto degli inibitori della tirosina chinasi di Bruton (BTKi) sulla cinetica di MRD in MCL.

In sintesi, i dati disponibili dimostrano il ruolo predittivo predominante di MRD nell'MCL. La maggior parte degli attuali trial clinici dell'MCL includono la negatività di MRD come endpoint secondario e alcuni studi, come LYMA-101, esplorano ulteriormente il valore del trattamento guidato da MRD in questo contesto.

1.2.3 Panorama attuale

Nonostante la sua rilevanza clinica, attualmente l'analisi MRD non è considerata adatta nella pratica clinica di routine e, quindi, il monitoraggio MRD dei singoli pazienti non è raccomandato (112). Tuttavia, dato il suo significato clinico, attualmente il monitoraggio è implementato nella maggior parte degli studi clinici che mirano alla massima citoriduzione nel linfoma mantellare, consentendo una valutazione più precisa delle nuove modalità di trattamento (137).

Il panorama diventa più complesso anche a causa delle numerose nuove opzioni di trattamento, dove il monitoraggio dell'MRD sarà di grande importanza per la valutazione della risposta. Infine, sarà necessaria un'attenta integrazione dei risultati MRD con i dati di risposta PET, così come i parametri clinici e genetici, in modo da sfruttare pienamente il potenziale della conoscenza biologica e clinica allo scopo di valutare ottimamente il rischio dei pazienti affetti da MCL (138).

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

2.1 Premessa scientifica

2.1.1 FIL MCL0208: analisi primaria

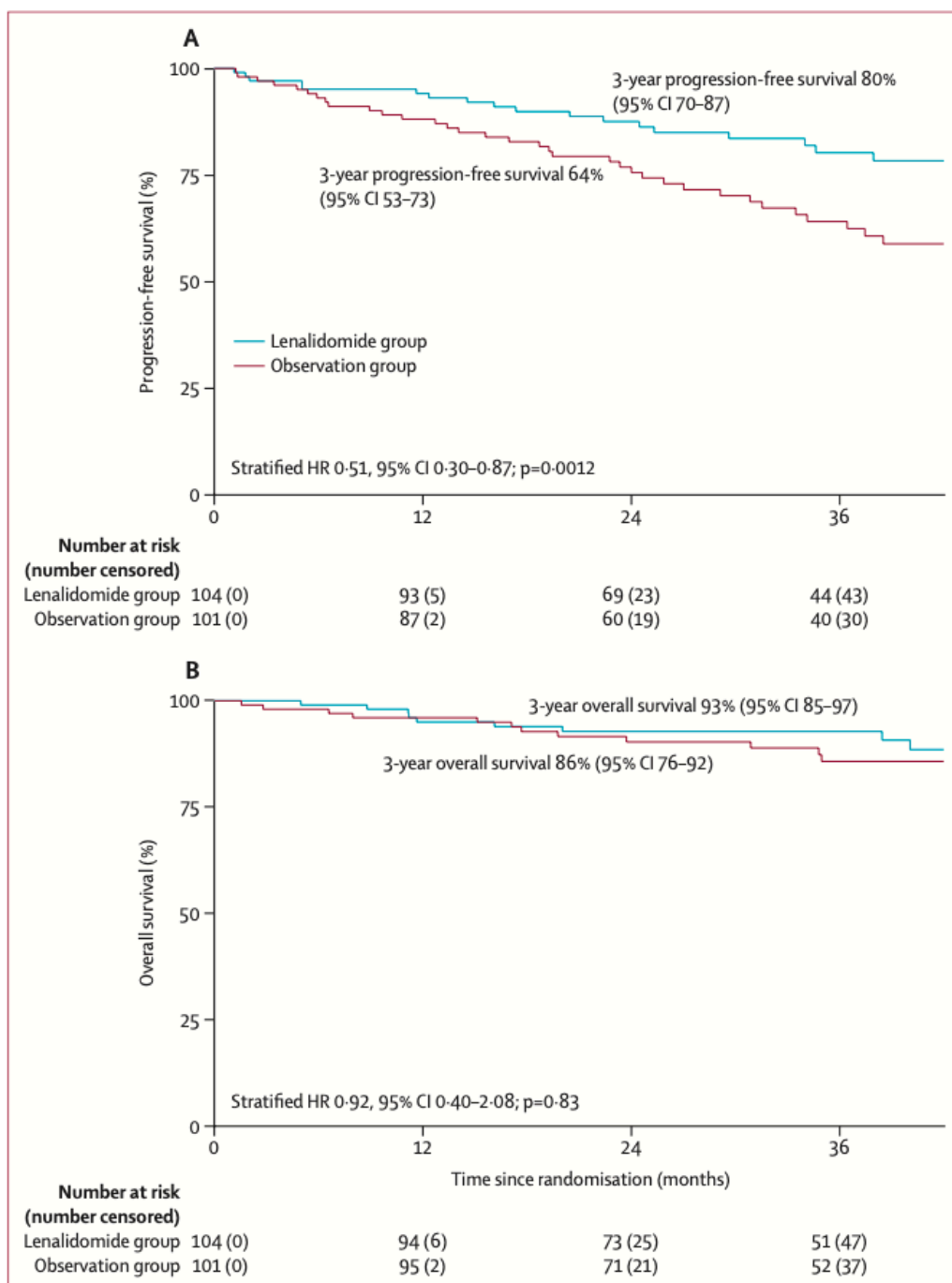
Lo studio clinico randomizzato di fase III MCL0208 della Fondazione Italiana Linfomi (FIL), di cui questa Tesi valuta risultati clinici e molecolari a lungo termine, ha valutato prospetticamente il beneficio del mantenimento con *lenalidomide* (LEN) rispetto all'osservazione (OBS) dopo chemio-immunoterapia intensiva con programma a dosi elevate di *rituximab* (HDS) e consolidamento con ASCT in pazienti adulti con MCL.

Lo studio ha arruolato 300 pazienti in Italia e Portogallo. Alla fine dell'induzione, o in caso di interruzione dello studio per coloro che non hanno completato la R-HDS a causa di effetti tossici o ritiro, si è registrata una risposta complessiva in 254 (85%) dei 300 pazienti. Di questi, 234 (78%) pazienti hanno avuto una remissione completa e 20 (7%) pazienti una remissione parziale. 30 (10%) pazienti hanno avuto una progressione della malattia.

41 (39%) su 104 pazienti hanno interrotto la *lenalidomide* per motivi, tra cui morte o progressione. Sono stati registrati decessi correlati al trattamento in 2 (2%) su 93 pazienti nel gruppo *lenalidomide* (1 polmonite, 1 porpora trombotica trombocitopenica) e 1 (1%) su 101 nel gruppo di osservazione (polmonite). 59 (63%) su 93 pazienti nel gruppo *lenalidomide* hanno avuto eventi avversi ematologici di grado 3–4 rispetto a 12 (12%) su 101 pazienti nel gruppo di osservazione ($p < 0,0001$). 29 (31%) su 93 pazienti nel gruppo *lenalidomide* e 8 (8%) su 101 pazienti nel gruppo di osservazione hanno avuto eventi avversi non ematologici di grado 3–4 ($p < 0,0001$), di cui le infezioni sono state le più comuni. Sono stati segnalati eventi avversi gravi in 22 (24%) su 93 pazienti nel gruppo *lenalidomide* e 5 (5%) su 101 pazienti nel gruppo di osservazione. La polmonite e altre infezioni sono stati gli eventi avversi gravi più comuni.

In conclusione, in questo trial si è osservato un miglioramento sostanziale nella PFS tra i pazienti con linfoma mantellare trattati con *lenalidomide* in mantenimento dopo un autotrapianto di cellule staminali ematopoietiche. Il regime posologico da 15 mg ha avuto una proporzione non trascurabile di interruzioni del trattamento e molti pazienti hanno richiesto riduzioni di dose. Tuttavia, l'intensità ridotta del trattamento non ha precluso un miglioramento clinicamente significativo nella sopravvivenza libera da progressione. Il follow-up è comunque troppo breve per trarre conclusioni definitive sulla sopravvivenza complessiva e sugli effetti tossici tardivi, inclusi i tumori secondari, fattori che verranno indagati in questa Tesi (62).

FIGURA 6: outcomes clinici nel gruppo con *lenalidomide* e nel gruppo di osservazione



[Fonte: Ladetto M, Cortelazzo S et. al *Lenalidomide maintenance after autologous haematopoietic stem-cell transplantation in mantle cell lymphoma: results of a Fondazione Italiana Linfomi (FIL) multicentre, randomised, phase 3 trial. Lancet Haematol. 2021]*

2.1.2 MRD MCL0208: analisi primaria

Lo studio ha incluso anche un ampio monitoraggio sistematico della malattia residua minima (MRD) sia nel sangue periferico (PB) che nel midollo osseo (BM), utilizzando sia nested che real-time PCR in 10 punti temporali rigorosamente fissati. I risultati MRD sono stati recentemente pubblicati, sottolineando l'alto valore prognostico sia dei modelli puntuali che cinetici, nello studio di Ferrero S, Grimaldi D, et al., *Punctual and kinetic MRD analysis from the Fondazione Italiana Linfomi MCL0208 phase 3 trial in mantle cell lymphoma*.

Tra i 300 pazienti arruolati nello studio MCL0208, un marcatore molecolare è stato identificato in 250 (83%), consentendo l'analisi di 234 pazienti, con 4351 risultati analitici da 10 punti temporali. Questo studio ha permesso di comprendere che l'analisi MRD è un potente indicatore prognostico nel linfoma mantellare e la RQ-PCR ASO è la tecnica MRD più affidabile in termini di previsione dell'esito. L'analisi MRD, inoltre, è più predittiva a partire dai 6 mesi dopo l'ASCT, anche se l'MRD ha un impatto clinico subito dopo l'ASCT.

Il BM sembra essere superiore per l'analisi MRD a singolo punto temporale, ma il PB è una fonte di tessuto altamente affidabile nei punti temporali successivi e il suo valore è notevolmente aumentato quando considerato nel contesto dell'analisi cinetica.

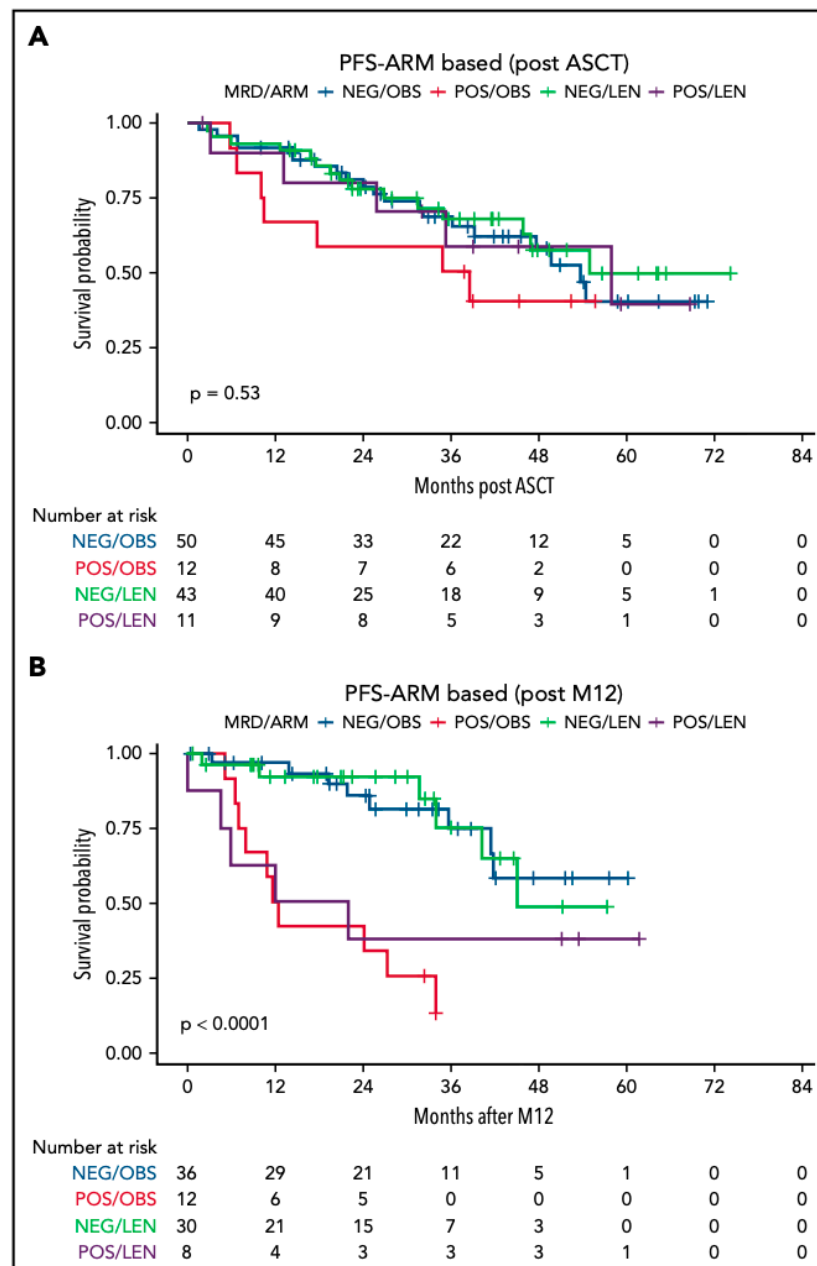
In considerazione a quanto ottenuto, si può affermare che un modello cinetico variabile nel tempo, basato sulla combinazione di risultati MRD regolarmente aggiornati e MIPI, è il modo migliore per sfruttare la massa di informazioni generate dall'analisi MRD e fornisce uno strumento potente per la stratificazione del rischio adatto al trattamento guidato dall'MRD.

Nello specifico, l'ASCT ha indotto alte percentuali di remissione molecolare (91% nel PB e 83% nel BM, mediante RQ-PCR). Tuttavia, il numero di pazienti con remissione clinica e molecolare persistente è diminuito nel tempo in entrambi i gruppi (fino al 30% dopo 36 mesi). La MRD ha predetto una progressione precoce e un esito a lungo termine, particolarmente a partire dai 6 mesi dopo l'ASCT.

Anche se i risultati MRD a M6 (6 mesi) hanno mostrato il miglior valore predittivo come singolo punto temporale in termini di previsione del Tempo alla Progressione (TTP, Time To Progression) è difficile concepire che un singolo punto temporale MRD possa catturare l'intera storia naturale di una malattia cronica e complessa come il Linfoma Mantellare. Pertanto, è stato sviluppato un modello dinamico che comprende sia il MIPI che un'analisi MRD variabile nel tempo e regolarmente aggiornata, tenendo particolarmente conto del valore prognostico negativo della ricomparsa di MRD dopo il termine del trattamento. Questo modello

cinetico ha superato i modelli predittivi statici in termini di Area Under the Receiver Operating Characteristic curve (AUROC), evidenziando l'importanza di adottare un approccio sistematico e ripetuto al monitoraggio MRD nella gestione dei pazienti con MCL.

FIGURA 5: Impatto dell'MRD sulla TTP, stratificato per braccio di randomizzazione. L'MRD è stato misurato tramite RQ-PCR nel BM in diversi punti temporali: qui sono mostrati i punti temporali dopo (A) l'ASCT e (B) M12.



[Fonte: Ferrero S, Grimaldi D, et al. Punctual and kinetic MRD analysis from the Fondazione Italiana Linfomi MCL0208 phase 3 trial in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2022]

Questo, inoltre, è il primo studio che indaga il ruolo dell'MRD nel contesto del trattamento di mantenimento nell'MCL (*figura 6*). Lo studio clinico FIL MCL0208 ha mostrato un vantaggio nella sopravvivenza libera da progressione per LEN rispetto all'OBS. In questo studio si è aggiunta un'ulteriore osservazione: tra i pazienti MRD-positivi si sono verificate meno recidive nel braccio del LEN. Inoltre, si è osservato che l'effetto biologico della *lenalidomide* sembrava essere principalmente esercitato durante il primo anno di mantenimento. Di conseguenza, i pazienti che erano MRD-positivi dopo l'ASCT hanno mostrato un miglior esito (non significativamente diverso da quelli MRD-negativi) se hanno ricevuto la *lenalidomide*. Tuttavia, i pazienti rimasti MRD-positivi o che si sono convertiti in positività MRD dopo 1 anno di *lenalidomide* hanno mostrato esiti scarsi simili a quelli dei pazienti MRD-positivi nell'OBS. Questo fenomeno potrebbe essere in parte spiegato dall'alto tasso di interruzione della *lenalidomide* (per motivi diversi dalla progressione della malattia) dopo M12, così come dall'esaurimento dell'efficacia della *lenalidomide* in alcuni casi.

Infine, lo studio non è stato in grado di identificare correlazioni chiare tra l'intensità della dose di *lenalidomide* e la cinetica MRD, anche se il numero limitato di pazienti con dati completi di MRD e dosaggio di *lenalidomide* ha ostacolato un'accurata analisi di sottogruppo di questo fenomeno. Gli effetti modulanti della terapia di mantenimento sui valori MRD devono essere investigati più approfonditamente in contesti di mantenimento diversi (ad esempio, *lenalidomide*, *rituximab* e *ibrutinib*), ma potrebbero spiegare il ruolo predittivo subottimale dell'analisi MRD puntuale ai punti temporali molto precoci. Infine, molti altri fattori biologici potrebbero influenzare la sensibilità del paziente alla *lenalidomide* stessa.

2.2 Obiettivo dello studio

In questa Tesi presentiamo l'aggiornamento dei risultati clinici e molecolari a lungo termine dello studio MCL0208.

Lo studio randomizzato di fase III MCL0208 della Fondazione Italiana Linfomi (FIL) ha valutato prospettivamente il beneficio del mantenimento con *lenalidomide* (LEN) rispetto all'osservazione (OBS) dopo chemio-immunoterapia intensiva con schema ad alto dosaggio di R (HDS) e consolidamento con ASCT. All'analisi del punto finale primario con un follow-up mediano di 38 (24-50) mesi dopo la randomizzazione, lo studio è risultato positivo con *lenalidomide*, che ha mostrato una superiorità nella sopravvivenza libera da progressione (PFS), senza beneficio nella sopravvivenza globale (OS). Lo studio ha incluso anche un ampio monitoraggio sistematico della malattia residua minima (MRD) sia nel sangue periferico (PB)

che nel midollo osseo (BM), in 10 punti temporali rigorosamente fissi, come precedentemente illustrato.

In questa Tesi presentiamo i risultati clinici e molecolari a lungo termine con un follow-up mediano (mFU) di 74 mesi (M) dalla randomizzazione, includendo quattro ulteriori punti temporali tardivi di MRD (M18, M24, M30, M36).

L'obiettivo primario dello studio, quindi, è la sopravvivenza libera da progressione (PFS) misurata dalla data della randomizzazione alla progressione, recidiva o morte da qualsiasi causa, secondo i Criteri Rivisti del 2007 per i Linfomi Maligni per i disturbi non avidi alla PET. Questo permette la valutazione dell'efficacia della *lenalidomide* come terapia di mantenimento per prolungare la PFS dopo il completamento della chemioterapia ad alta dose di prima linea associata a *rituximab* e seguita da ASCT in pazienti adulti con MCL in uno studio a lungo termine, con un follow up mediano di 74 mesi.

Gli endpoint secondari sono la sopravvivenza complessiva (OS), la sopravvivenza libera da eventi (EFS), la sopravvivenza libera da malattia (DFS), il tasso di risposta globale (ORR), il tasso di risposta completa (CRR), la sicurezza e i tumori secondari (SM). Ulteriori endpoint secondari sono basati sulla MRD, sulla qualità della vita e sull'efficacia economica.

In questa Tesi sono presentati i risultati clinici e molecolari a lungo termine, con un follow-up di 84 mesi dalla registrazione e 74 mesi dalla randomizzazione. La tossicità è stata analizzata in termini di tumori secondari riportate durante il periodo di follow-up.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Disegno dello studio

FIL-MCL0208 è uno studio di fase III, multicentrico, in aperto, randomizzato e controllato, progettato per determinare l'efficacia della *lenalidomide* (LEN) rispetto all'osservazione (OBS) in pazienti giovani (18-65 anni), in forma, in stadio avanzato (Ann Arbor III-IV o stadio II con malattia voluminosa ≥ 5 cm] o sintomi B) precedentemente non trattati, con linfoma mantellare.

Questo studio non cieco è stato condotto secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki e nel rispetto degli standard di Buona Pratica Clinica. Il protocollo è stato revisionato e approvato dal comitato etico indipendente di tutti i centri partecipanti. Il consenso informato scritto (CIS) è stato ottenuto da tutti i pazienti. Tutti i pazienti hanno inoltre fornito il consenso informato scritto per l'uso dei loro campioni biologici a scopo di ricerca, in conformità ai requisiti dei Comitati Etici Istituzionali e alla dichiarazione di Helsinki.

Il protocollo MCL0208 prevede diverse fasi:

- *Fase di screening*

I pazienti con MCL venivano sottoposti a esami emocromocitometrici completi (CBC) e test chimici sierici entro 7 giorni prima della prima dose del farmaco dello studio. La TC del torace, dell'addome e del bacino e i campioni di midollo osseo venivano ottenuti durante la fase di screening/baseline dello studio e non oltre un mese prima che il paziente avesse approvato e firmato il modulo di consenso informato. Il campione di biopsia deve essere inviato all'Anatomia Patologica centrale il prima possibile, preferibilmente prima della randomizzazione, per la conferma della diagnosi di MCL.

- *Fase di trattamento*

Al termine della fase di screening, i pazienti idonei entravano nella fase di trattamento consistente in una fase di induzione (3 cicli di R-CHOP, somministrati ogni 21 giorni) seguita da una fase di consolidamento (*ciclofosfamide* ad alto dosaggio (CTX), 2 cicli di *Ara-C* ad alto dosaggio, BEAM e ASCT).

- *Fase di randomizzazione e fase di mantenimento*

Dopo il completamento della chemioterapia ad alto dosaggio di prima linea aggiunta con *rituximab* e seguita da ASCT, i pazienti che avevano ottenuto una risposta completa o parziale venivano randomizzati tra il mantenimento con *lenalidomide* o l'osservazione. La randomizzazione dovrebbe avvenire entro 120 giorni dopo la data di ASCT e deve essere eseguita solo quando i pazienti hanno raggiunto un recupero ematologico sufficiente ($ANC \geq 1,5 \times 10^9/L$; piastrine $\geq 100 \times 10^9/L$; Hb ≥ 10 g/dL).

Durante la *fase di mantenimento/osservazione*, i pazienti erano sottoposti a esami fisici mensili, determinazione dell'ECOG-PS, emocromo completo e biochimica ematica, e valutazioni periodiche della qualità della vita.

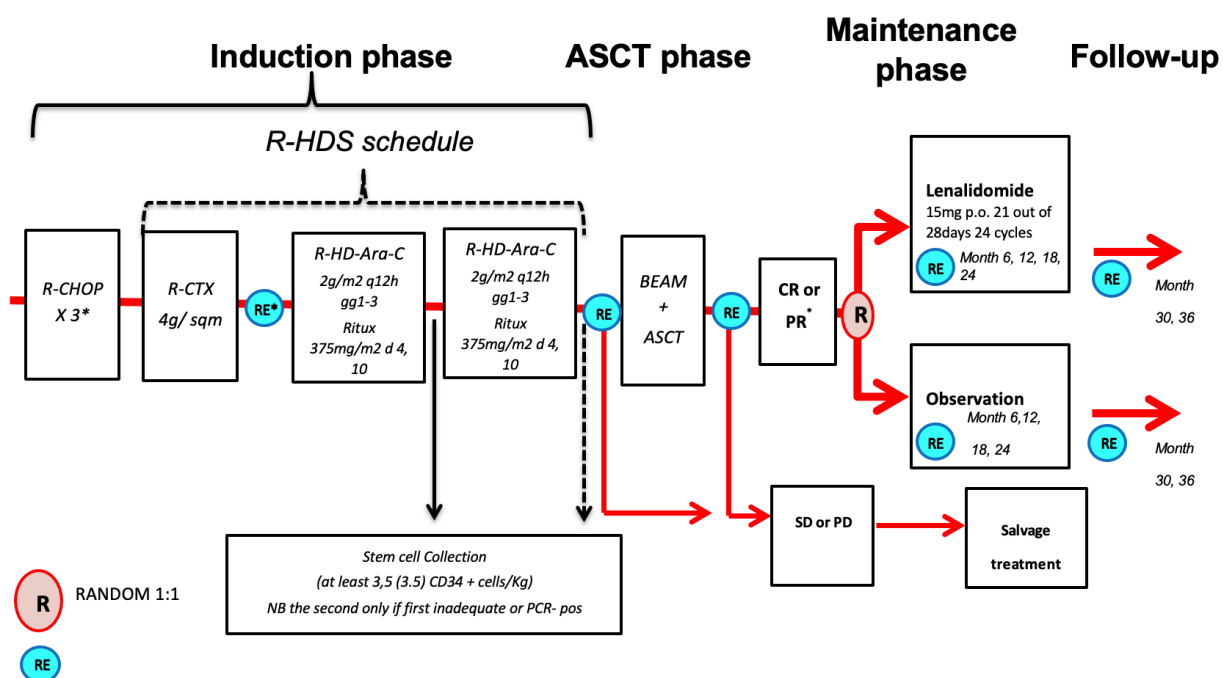
- *Fase di follow-up*

Tutti i pazienti erano seguiti per 74 mesi dalla randomizzazione o dall'interruzione della terapia. Durante il follow-up, i pazienti venivano valutati tramite l'osservazione clinica, TC, test di laboratorio almeno ogni 3 mesi per il primo anno dopo la fine del trattamento e poi ogni 6 mesi per altri due anni. Dopo il terzo anno, i pazienti venivano seguiti con visite a discrezione dell'ematologo locale. Era richiesto che i pazienti venissero visti almeno due volte all'anno per esame clinico e per gli esami ematici. La TC era obbligatoria per qualsiasi sospetto clinico di ricaduta, comparsa di adenopatie, organomegalia o alterazioni degli esami del sangue. Le richieste venivano inviate ai centri due volte all'anno dagli uffici FIL per aggiornare lo stato della malattia e informare sulle tossicità tardive o sui tumori secondari.

I pazienti che interrompevano il trattamento a causa della malattia in progressione o recidiva venivano seguiti con visita clinica o contatto telefonico documentato ogni 90 giorni (± 14 giorni) per la sopravvivenza e per la prima terapia anti-linfoma successiva.

I pazienti che interrompevano il trattamento per motivi diversi dalla malattia in progressione o recidiva venivano seguiti con visite cliniche e TC ogni 180 giorni (± 14 giorni) per valutare lo stato della malattia (esame fisico) fino alla progressione della malattia o alla recidiva. Dopo che è avvenuta la progressione della malattia o la recidiva, i pazienti erano seguiti con visita clinica o contatto telefonico documentato ogni 90 giorni (± 14 giorni) per la sopravvivenza e per la prima terapia anti-linfoma successiva (compreso il momento della migliore risposta e il tempo della migliore risposta al primo regime di salvataggio anti-linfoma utilizzato dopo l'interruzione da questo studio).

FIGURA 6: disegno dello studio



3.2 Criteri di inclusione e di esclusione

Criteri di inclusione

1. Qualsiasi adulto di sesso maschile o femminile con linfoma mantellare di nuova diagnosi secondo i criteri dell'OMS.
2. Linfoma Non-Hodgkin a cellule mantellari confermato da biopsia, compresa l'evidenza di sovraespressione della ciclina D1 o della traslocazione t(11;14)(q13;q32) mediante FISH o RT-PCR. Nei soggetti negativi per la ciclina D1, l'evidenza della sovraespressione della ciclina D2 o D3 tramite immunostaining era accettabile.
3. Età ≥ 18 anni e < 60 con stato di performance ECOG 0-3 o un'età compresa tra 60 e 65 anni con stato di performance ECOG 0-2, tranne quando il deterioramento dello stato di performance è correlato al NHL.
4. Stadio avanzato (stadio III e IV secondo Ann Arbor e stadio II con malattia voluminosa definita come una massa ≥ 5 cm o sintomi B).
5. Malattia misurabile (due diametri) in almeno un sito. Le lesioni ossee osteoblastiche, l'ascite e l'effusione pleurica non sono considerate malattia misurabile.
6. Consenso informato scritto prima di qualsiasi procedura di screening specifica dello studio, con la comprensione che il paziente ha il diritto di ritirarsi dallo studio in qualsiasi momento, senza pregiudizio.
7. Essere disposti e in grado di rispettare il protocollo per la durata dello studio.

8. Le donne in età fertile (FCBP) devono avere due test di gravidanza negativi supervisionati medici prima dell'inizio della terapia dello studio e devono accettare il monitoraggio continuo della gravidanza durante il corso dello studio e dopo la fine della terapia dello studio. Ciò si applica anche se la paziente pratica astinenza completa e continuativa dal rapporto sessuale. Era necessario impegnarsi a mantenere l'astinenza dal rapporto sessuale eterosessuale (che deve essere riesaminato mensilmente) o accettare di utilizzare ed essere in grado di rispettare una contraccezione efficace senza interruzioni, 28 giorni prima dell'inizio del farmaco dello studio, durante la terapia dello studio (comprese le interruzioni della dose) e per 28 giorni dopo l'interruzione della terapia dello studio.
9. I pazienti di sesso maschile dovevano accettare di utilizzare un preservativo durante il contatto sessuale con una FCBP, anche se hanno subito una vasectomia, durante tutta la terapia farmacologica dello studio, durante qualsiasi interruzione della dose e dopo la cessazione della terapia dello studio. Dovevano accettare di non donare sperma durante la terapia farmacologica dello studio e per un periodo dopo la fine della terapia farmacologica dello studio.
10. Tutti i pazienti dovevano avere una comprensione del potenziale rischio teratogeno del farmaco dello studio. Dovevano accettare di astenersi dalla donazione di sangue durante la terapia farmacologica dello studio e dopo la cessazione della terapia farmacologica dello studio. Dovevano accettare di non condividere il farmaco dello studio con un'altra persona. Dovevano essere informati sulle precauzioni contro la gravidanza e sui rischi di esposizione fetale.

Criteri di esclusione

1. Sottotipi di linfoma Non-Hodgkin diversi dal MCL
2. Variante citologica con piccole cellule con nuclei rotondi che imitano la CLL, spesso riconosciuta nei pazienti con presentazione leucemica e splenomegalia senza o con coinvolgimento minimo dei linfonodi e che ha un decorso clinico indolente.
3. Storia di malignità diversa dal carcinoma squamocellulare, dal carcinoma basocellulare della pelle o dal carcinoma in situ della cervice, carcinoma in situ del seno, ritrovamento istologico incidentale di carcinoma prostatico (stadio TNM di T1a o T1b) negli ultimi 3 anni.
4. Intervento chirurgico maggiore, diverso dalla chirurgia diagnostica, nelle ultime 4 settimane.

5. Evidenza di coinvolgimento del sistema nervoso centrale, pazienti con storia di crisi epilettiche non controllate, disturbi del sistema nervoso centrale o disabilità psichiatriche considerate dallo sperimentatore clinicamente significative e che influenzano negativamente l'aderenza ai farmaci dello studio. Se clinicamente indicato, la puntura lombare e la risonanza magnetica potevano essere eseguite durante il processo di screening.
6. Malattia cardiaca clinicamente significativa (ad es. insufficienza cardiaca congestizia, malattia coronarica sintomatica e aritmie cardiache non ben controllate con farmaci) o infarto miocardico negli ultimi 6 mesi (malattia cardiaca di classe III o IV della New York Heart Association) e grave compromissione della funzione polmonare (capacità di diffusione polmonare <50%).
7. Valori ematologici inaccettabili nella settimana precedente all'inizio dello studio: emoglobina <9 g/dL, WBC <3x10⁹/L, piastrine <60x10⁹/L, conta assoluta dei neutrofili (ANC) <1.5x10⁹/L (a meno che la citopenia non sia secondaria al coinvolgimento del midollo osseo o alla citopenia autoimmune correlata al linfoma).
8. Test di funzionalità epatica anormali, entro una settimana prima dell'inizio dello studio sopra uno qualsiasi dei valori elencati: bilirubina sierica > 2 mg/dL, ALT o AST > 3 volte il valore normale superiore; fosfatasi alcalina > 2,5 volte il valore normale superiore (a meno che queste anomalie non siano dovute al coinvolgimento epatico del linfoma).
9. Funzione renale anomala (creatinina sierica >2.0 mg/dL), a meno che non fosse correlata alla malattia.
10. Pazienti con infezioni opportunistiche attive.
11. Sieropositività conosciuta o infezione virale attiva con virus dell'immunodeficienza umana (HIV), virus dell'epatite B (HBV) o virus dell'epatite C (HCV). I pazienti sieropositivi a causa del vaccino contro il virus dell'epatite B sono idonei. I pazienti con sierologia HBcAb non sono stati esclusi dallo studio e hanno ricevuto *lamivudina* come profilassi a partire da una settimana prima della chemioterapia. I pazienti nel braccio di mantenimento hanno ricevuto *lamivudina* durante il trattamento (24 mesi) e per altri 12 mesi dopo la fine della terapia con *lenalidomide*. A questo proposito, il monitoraggio è stato effettuato con HBV DNA se disponibile, altrimenti con HbsAg e AST/ALT.
12. Donne in stato di gravidanza o in allattamento.

3.3 Trattamento e procedura

I pazienti idonei hanno eseguito un esame clinico, un emocromo completo e test chimici sierici entro 7 giorni prima del primo ciclo di chemioterapia. I pazienti hanno eseguito una TC del torace, dell'addome e del bacino e sono stati ottenuti campioni di midollo osseo durante la fase di screening (e non più tardi di 1 mese prima che il paziente firmasse il modulo di consenso informato scritto).

Dopo una pre-fase facoltativa con *vincristina* e *steroidi* (*vincristina* intravenosa 1,4 mg/m² il giorno 1, *prednisone* per via orale 100 mg nei giorni 1-5), i pazienti hanno ricevuto tre cicli di R-CHOP (ciclo di 21 giorni, *rituximab* intravenoso ad alta dose 375 mg/m² il giorno 1; *doxorubicina* intravenosa 50 mg/m², *vincristina* 1,4 mg/m² [massimo 2 mg] e *ciclofosfamida* 750 mg/m² il giorno 2; *prednisone* per via orale 100 mg/m² nei giorni 2-6). In questo studio, R-HDS consiste in R-CTX (*ciclofosfamida* intravenosa ad alta dose 4 g/m² il giorno 1, *rituximab* intravenoso 375 mg/m² il giorno 4).

Dopo il restaging, i pazienti hanno ricevuto due cicli di R-HD-citarabina (*citarabina* intravenosa ad alta dose 2 g/m² ogni 12 ore nei giorni 1-3; *rituximab* intravenoso 375 mg/m² nei giorni 4 e 10).

Le cellule staminali periferiche CD34⁺ (PBSCs) sono state raccolte secondo le procedure locali dopo il primo corso di R-HD-citarabina. Sono state richieste almeno $3,5 \times 10^6$ cellule CD34⁺ per kg. Le PBSCs sono state raccolte una seconda volta solo nei pazienti con raccolta inadeguata o senza negatività della malattia residua minima documentata nelle PBSCs raccolte.

Dopo aver completato l'intera sequenza di R-HDS [R-CTX e R-HD-citarabina], i pazienti con remissione completa o parziale (valutata con TC secondo i criteri del Gruppo di Lavoro Internazionale del 2007 per i linfomi non PET-avidi) sono andati incontro al trapianto di cellule staminali autologhe (ASCT). Il regime di condizionamento prevedeva BEAM (*carbimustina* intravenosa 300 mg/m² il giorno -6; *etoposide* intravenoso 200 mg/m² nei giorni -5, -4, -3 e -2; *citarabina* intravenosa 400 mg/m² nei giorni -5, -4, -3 e -2, *melphalan* intravenoso 140 mg/m² il giorno -1, reinfusione di PBSC il giorno 1, e fattore stimolante la crescita dei granulociti G-CSF 5 µg/kg dal giorno 2 fino a che l'ANC > $1,5 \times 10^9$ cellule per L). Sono state infuse almeno $3,5 \times 10^6$ PBSCs per kg per supportare l'ASCT autologo. Il G-CSF sottocutaneo 5 µg/kg è stato somministrato dal giorno successivo a ogni ciclo di chemioterapia ad alta dose fino al recupero o al completamento del prelievo di PBSC.

I pazienti in remissione completa o parziale con ripresa ematologica (ANC $>1.5 \times 10^9$ cellule/L e piastrine $>60 \times 10^9$ cellule/L) entro 120 giorni dopo l'ASCT autologo sono stati assegnati a ricevere *lenalidomide* per via orale (15 mg al giorno per i pazienti con piastrine $>100 \times 10^9$ cellule/L o 10 mg al giorno per piastrine $60-100 \times 10^9$ cellule/L, giorni 1-21 ogni 28 giorni) per 24 mesi, o osservazione.

Il trattamento è stato continuato per 24 mesi o fino alla progressione della malattia, agli effetti tossici inaccettabili o al ritiro volontario del paziente.

Se si verificavano effetti tossici, il trattamento con *lenalidomide* veniva interrotto o modificato. La frequenza e la gravità degli eventi avversi sono stati registrati sulla base dei Criteri di Terminologia Comune degli Eventi Avversi (CTCAE) dell'Istituto Nazionale per il Cancro, versione 4.0. Gli eventi avversi sono stati valutati durante le visite di follow-up o quando diversamente notificati. Gli eventi avversi gravi sono stati definiti come eventi avversi che comportano morte, considerati potenzialmente letali dagli investigatori, quelli che richiedono il ricovero in ospedale o un prolungamento del ricovero, quelli che comportano una significativa disabilità o incapacità (una perturbazione sostanziale della capacità del paziente di svolgere funzioni vitali normali), anomalie congenite o difetti congeniti, e quelli che costituiscono un importante evento medico. L'uso profilattico di *filgrastim* è consentito e utilizzato per sostenere il recupero dell'ANC e per prevenire la neutropenia febbrile, anche quando non specificamente raccomandato.

Durante le fasi di trattamento e consolidamento, la sicurezza è stata valutata prima e dopo l'amministrazione della chemioterapia mediante ematologia e chimica del sangue, inclusi proteine totali, albumina, calcio, glucosio, acido urico, bilirubina totale, fosfatasi alcalina, alanina amino-trasferasi, aspartato aminotransferasi, creatinina e deidrogenasi lattica; stato di performance ECOG; segni vitali; esami fisici; peso corporeo; e farmaci concomitanti. Durante il mantenimento e nel gruppo di osservazione, i pazienti sono stati osservati clinicamente ogni mese e sono andati incontro a determinazione dello stato di performance ECOG, emocromo completi e biochimica ematica, e valutazioni periodiche della qualità della vita. Questi esami sono stati eseguiti almeno ogni 3 mesi nel periodo di follow-up post-mantenimento e di osservazione.

La risposta alla terapia è stata valutata localmente secondo i Criteri Rivisti del 2007 per i Linfomi Maligni per i disturbi non PET-avidi. La risposta è stata valutata mediante TC dopo R-HD-CTX, prima e dopo l'ASCT autologo, e poi durante il mantenimento o l'osservazione a

6, 12, 18 e 24 mesi, e durante il follow-up. La PET non era obbligatoria ma suggerita prima e dopo l'ASCT autologo, ma non è stata utilizzata per la valutazione della risposta come stabilito dai criteri di risposta.

3.4 Raccolta dei dati e analisi statistica

3.4.1 Analisi clinica

Le analisi statistiche sono state eseguite in riferimento a diverse popolazioni: la popolazione arruolata, comprendente tutti i pazienti inizialmente arruolati nello studio, la popolazione da trattare (Intention To Treat, ITT), comprendente tutti i pazienti assegnati in modo casuale a LEN o OBS, e la popolazione di sicurezza, comprendente tutti i pazienti che hanno ricevuto almeno una dose del trattamento assegnato. Gli endpoint del tempo all'evento, inclusi Progression-Free Survival (PFS), Overall Survival (OS), Event-Free Survival (EFS) e Disease-Free Survival (DFS), sono stati stimati utilizzando il metodo di Kaplan-Meier a partire dalla data di arruolamento per la popolazione arruolata e dalla data di randomizzazione per la popolazione ITT.

Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando un test log-rank stratificato, con strati definiti secondo la risposta clinica e molecolare alla randomizzazione.

Gli hazard ratio (HR) sono stati stimati con il modello di Cox stratificato e aggiustati per il MIPI in un'analisi di sensibilità aggiuntiva. Per tenere conto di un potenziale cambiamento nell'effetto di LEN sulla PFS nel tempo, abbiamo condotto analisi aggiuntive. Nella prima analisi, abbiamo incluso una covariata dipendente dal tempo nel modello di Cox. Questa covariata è stata utilizzata per modellare l'effetto di LEN in base al tempo trascorso dalla randomizzazione, distinguendo tra periodi prima e dopo 36 o 42 mesi. Nella seconda analisi, abbiamo utilizzato un metodo di sopravvivenza parametrico flessibile per modellare i rischi di PFS dei gruppi di randomizzazione in funzione del tempo dalla randomizzazione. Questi approcci ci hanno permesso di affrontare efficacemente gli effetti variabili nel tempo del trattamento sulla PFS. L'incidenza cumulativa dei tumori secondari è stata stimata utilizzando il metodo proposto da Gooley. La morte senza tumori secondari è stata considerata un evento competitivo e i confronti tra i gruppi sono stati effettuati utilizzando il modello di Fine e Gray, aggiustato per il MIPI.

3.4.2 Analisi MRD

Uno degli endpoints secondari dello studio è quello di valutare l'impatto prognostico dell'analisi della MRD e della cinetica della malattia tramite RQ-PCR sul tempo mediano alla progressione (TTP), così come valutare l'attività della *lenalidomide* sulla MRD.

Il midollo osseo (MO) e il sangue periferico (SP) sono stati raccolti in citrato di sodio e eparina di litio rispettivamente al momento della diagnosi, durante il trattamento (fase di induzione dopo R-CTX; fase di consolidamento dopo R-HD-ARAC; post-ASCT; durante LEN o OBS, ogni 6 mesi, M6 e M12) e al follow-up (FU) secondo i seguenti punti temporali di riposizionamento clinico: M18, M24, M30, M36.

Al basale, è stata eseguita citofluorimetria a 4 colori per valutare l'infiltrazione tumorale sia nei campioni di MO che di SP. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il reagente DNazol (Life Technologies, Carlsbad, CA) e un estraattore semiautomatico Maxwell (Promega, San Francisco, CA).

Per protocollo, i marcatori molecolari per il monitoraggio del MRD sono stati investigati al basale nel MO e/o nel SP, a partire dal tessuto più infiltrato. I segnali PCR positivi sono stati sequenziati direttamente utilizzando l'approccio di Sanger; i riarrangiamenti clonali della catena pesante delle immunoglobuline (IGH) e il cluster di traslocazione maggiore BCL1/IGH (MTC) sono stati annotati utilizzando Blast e IMGT.

Come descritto nel precedente capitolo, la MRD è stata prima analizzata utilizzando la nested-PCR su campioni di MO e SP e, quindi, se era disponibile un DNA residuo adeguato, mediante RQ-PCR. Per determinare i livelli quantitativi di MRD, i numeri di copie di target sono stati correlati al numero di copie di target al momento della diagnosi. I risultati di RQ-PCR sono stati valutati secondo i criteri del gruppo di standardizzazione EuroMRD.

Il ruolo prognostico dell'analisi MRD è stato investigato riguardo a OS e TTP (tempo alla progressione, misurato dal momento di ciascuna determinazione MRD fino alla progressione del linfoma o alla morte). Data la molteplicità di aggiornamenti dello stato MRD durante il follow-up, l'effetto della positività MRD su OS e TTP è stato valutato attraverso varie analisi landmark in punti temporali specifici (R-CTX, R-HD-ARAC, post-ASCT, M6, M12, M18, M24, M30, M36). È stata condotta un'analisi completa sull'intero follow-up, utilizzando la positività MRD come variabile tempo-dipendente, per evitare il bias del tempo immortale. Ciò ha comportato la suddivisione del tempo di follow-up dei pazienti in base alle date delle

determinazioni MRD e l'aggiornamento dello stato MRD di conseguenza. L'impatto della positività MRD su OS e TTP è stato stimato utilizzando il modello di Cox, aggiustato per il punteggio MIPI. Le determinazioni MRD entro 60 giorni dall'ultimo follow-up per TTP sono state escluse per evitare di sovrastimare la capacità predittiva riguardo alla progressione della malattia.

La capacità discriminativa dei modelli di Cox che incorporano le determinazioni MRD come variabile tempo-dipendente è stata confrontata con i modelli basati su una singola valutazione MRD post-ASCT e post-M6, aggiustati per MIPI e misurando OS e TTP dalla determinazione M6. Le AUC variabili nel tempo sono state stimate nel tempo di follow-up per valutare le prestazioni del modello, utilizzando la funzione `risksetAUC` in R (pacchetto `risksetROC`).

Il rapporto sui punti temporali di rilevamento precoce del MRD è stato precedentemente pubblicato; in questa Tesi forniamo i risultati molecolari a lungo termine, compresi quattro punti temporali di MRD tardiva aggiuntivi (M18, M24, M30, M36).

4. RISULTATI CLINICI E MOLECOLARI

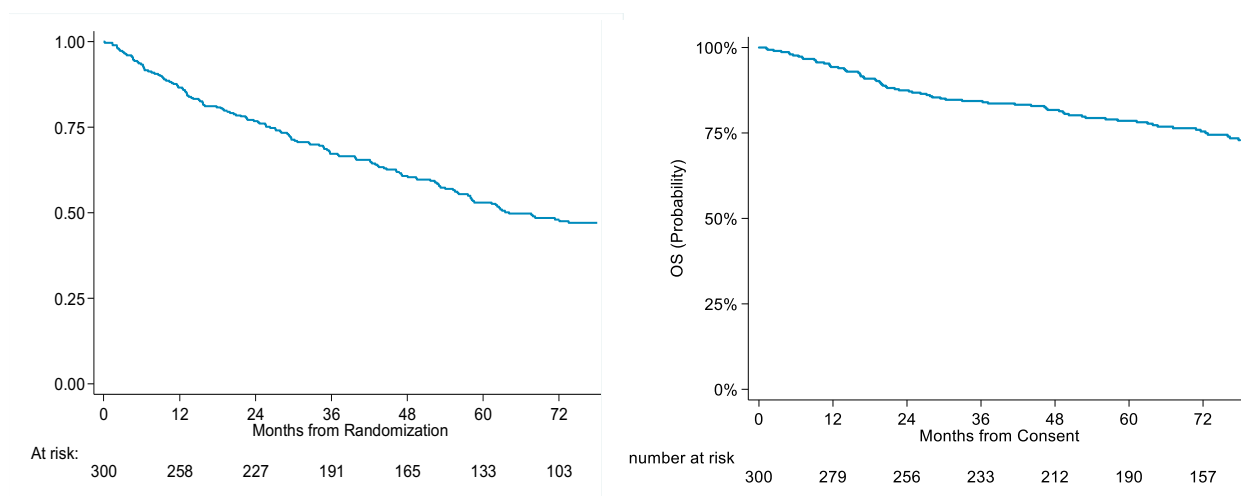
4.1 Risultati di efficacia

Dal 4 maggio 2010 al 24 agosto 2015 un totale di 303 pazienti è stato incluso nello studio. Il 1 marzo 2018 era prevista l'analisi dell'endpoint primario.

Alla data pianificata della prima analisi il follow-up mediano era di 48 mesi (IQR 8,0-88,0) dall'arruolamento dell'intera popolazione e di 38 mesi (IQR 24,0-50,0) dalla randomizzazione. La PFS a 48 mesi era del 60% (IC 95%: 54-66) e la OS a 48 mesi era del 82% (IC 95%: 76-86).

Al momento dell'analisi a lungo termine presente, il follow-up mediano è di 84 mesi dall'arruolamento e di 73 mesi dalla randomizzazione. La Progression Free Survival (PFS) mediana della popolazione arruolata è di 64 mesi (IC 95%: 56-85), mentre l'Overall Survival (OS) mediana della popolazione arruolata non è stata raggiunta. La PFS a 72 mesi è del 48% (IC 95%: 42-54) e la OS a 72 mesi è del 75% (IC 95%: 70-80) (figura 7).

FIGURA 7: PFS e OS dall'arruolamento



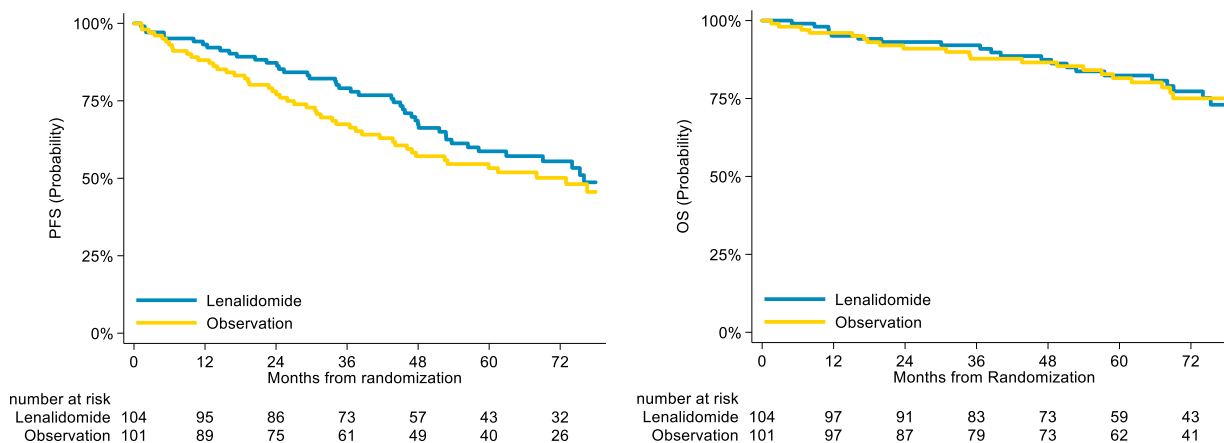
72M-PFS 48% (IC 95%: 42-54) mPFS 64M

72M-OS 75% (IC 95%: 70-80) mOS NR

Al momento dell'analisi a lungo termine presente, inoltre, 44 dei 104 pazienti nel braccio LEN hanno avuto un evento PFS rispetto ai 51 dei 101 pazienti nel braccio OBS. La PFS mediana dalla randomizzazione era di 76 mesi (IC 95%: 56-non raggiunto) nel gruppo LEN rispetto a 73 mesi (IC 95%: 46-90) nel braccio OBS. I tassi di PFS a 72 mesi erano del 55% (IC 95%: 44-65) nel braccio LEN e del 50% (IC 95%: 39-60) nel braccio OBS. Questo ha portato a un valore di $p = 0.177$ del log-rank test stratificato e un hazard ratio (HR) stratificato di 0.76

(IC 95%: 0.51-1.14). La OS mediana dalla randomizzazione non è stata raggiunta in entrambi i bracci. A 72 mesi, i tassi di OS erano molto vicini tra il braccio LEN (77%, IC 95%: 66-85) e il braccio OBS (75%, IC 95%: 64-83). Il log-rank test stratificato ha prodotto un valore di $p = 0.828$ con un HR stratificato di 0.94 (IC 95%: 0.53-1.66) (figura 8).

FIGURA 8: PFS e OS dalla randomizzazione



LEN: 72M-PFS 55% (44-65) mPFS 76M

LEN: 72M-OS 77% (66-85) mOS NR

OBS: 72M-PFS 50% (39-60) mPFS 73M

OBS: 72M-OS 75% (64-83) mOS NR

La valutazione degli effetti variabili nel tempo ha mostrato un vantaggio di PFS a favore di LEN fino a 36 e 42 mesi (HR 0.58, 0.33-1.00; $p = 0.048$ e HR 0.57, 0.34-0.95; $p = 0.032$, rispettivamente) (figura 9, A-B).

Tuttavia, si è osservata una successiva diminuzione del beneficio di PFS durante il periodo di follow-up dopo 36 e 42 mesi (rispettivamente HR 1.07, 0.59-1.93; $p = 0.83$ e HR 1.21, 0.63-2.32; $p = 0.565$) (figura 9, C-D). Infatti, nel braccio LEN, il tasso di rischio mensile per PFS durante i primi 24 mesi post-randomizzazione (quando LEN veniva somministrato) variava dallo 0.5% allo 0.7%. Questo tasso gradualmente aumentava (dallo 0.7% allo 0.95%) dal mese 24 al 36, per poi diventare comparabile tra i due bracci (circa 1% da 36 a 60 mesi).

FIGURA 9: analisi effetti variabili nel tempo della PFS

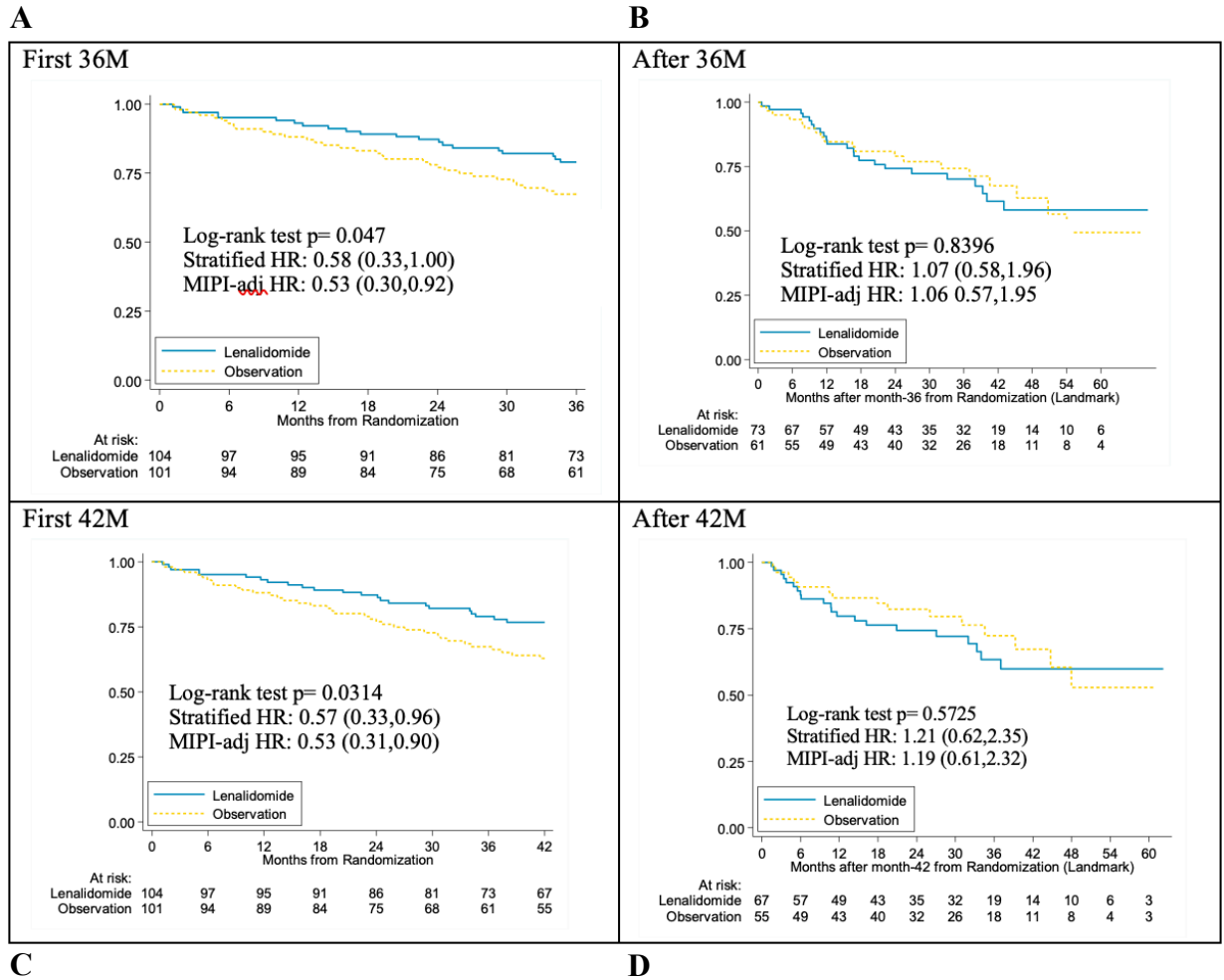
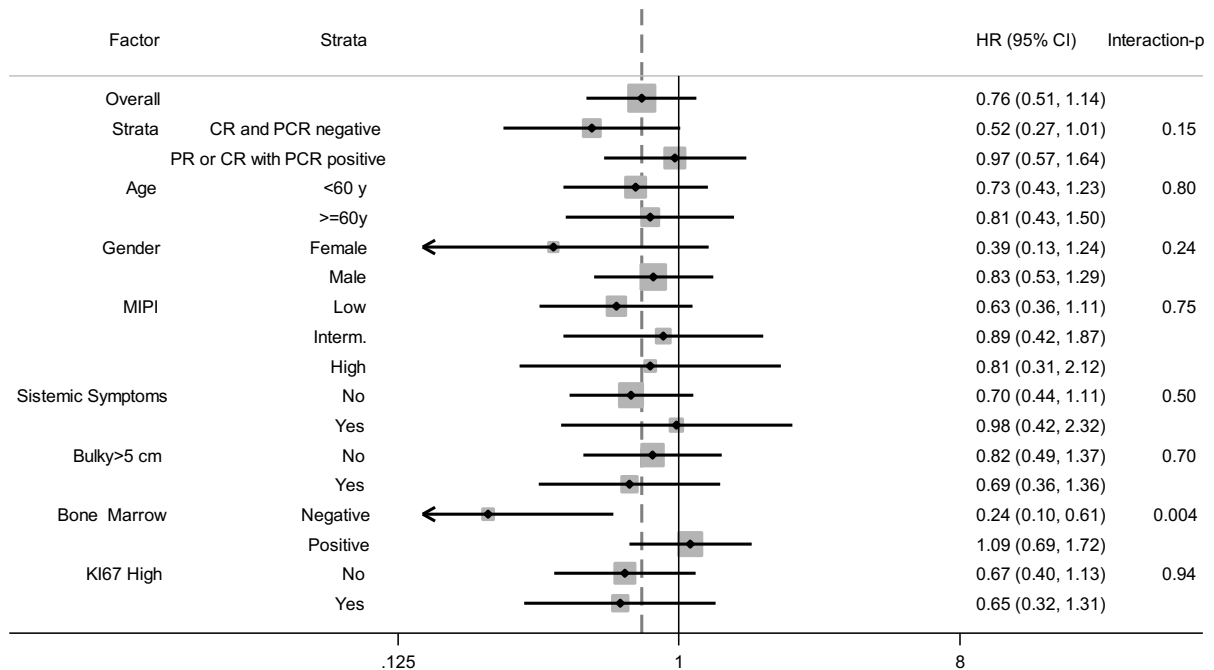


FIGURA 10: analisi di sottogruppo della PFS



Abbiamo anche condotto un'analisi di sottogruppo della PFS per valutare se l'effetto di LEN fosse più pronunciato in specifici sottogruppi di pazienti. In linea con i risultati delle analisi intermedie precedenti, i pazienti senza coinvolgimento del midollo osseo alla diagnosi sembravano trarre maggiore beneficio dal trattamento sperimentale (HR 0.24 vs 1.09, p di interazione = 0.004). Analogamente, tra i pazienti con risposta CR e PCR negativa, si osserva un beneficio più pronunciato di LEN rispetto agli altri pazienti, sebbene con evidenze più deboli (HR 0.52 vs 0.97, p di interazione = 0.150) (*figura 10*).

Altri parametri investigati, come ad esempio sintomi sistemici, MIPI, malattia voluminosa e Ki-67 non sembravano avere un impatto sull'effetto del LEN (*tabella 6*).

TABELLA 6: analisi multivariata PFS

	HR	p
MIPI intermedio vs MIPI basso	1.39	0.078
MIPI alto vs MIPI basso	1.86	0.008
Maschi vs Femmine	1.82	0.008
Sintomi B	1.19	0.344
Malattia bulky	1.57	0.008
Coinvolgimento osseo	1.27	0.272
Ki67 alto	1.36	0.090
MIPIc L-I vs L	1.17	0.435
MIPIc H-I vs L	1.05	0.865
MIPIc H vs L	2.22	0.004
LEN	0.80	0.288

Globalmente, si sono verificate 30 neoplasie secondarie (Secondary Malignancies, SM) nella popolazione arruolata (incidenza a 60 mesi dal consenso 8.0%, IC 95%: 5.2-11.6. Inoltre, si sono verificate 12 SM nella popolazione non randomizzata (incidenza a 60 mesi dal consenso 10.4%, IC 95%: 3.9-16.9) e 15 SM nella popolazione randomizzata (incidenza a 60 mesi dalla randomizzazione 6.9 (3.1-10.6)) (*figura 11, A-B*).

In termini di SM, abbiamo registrato 9 (4.5%) tumori solidi nella popolazione randomizzata (6 (6%) 1 stomaco, 1 prostata, 1 colecisti, 1 pancreas, 1 vescica, 1 polmone nel braccio LEN rispetto a 3 (3%) 1 polmone, 1 intestino, 1 prostata nel gruppo OBS), inclusi 1

cancro della pelle, così come 4 (2%) casi di sindrome mielodisplastica secondaria (MDS) e leucemia mieloide acuta (AML) (3 (3%) nel braccio LEN e 2 (1%) nel gruppo OBS) (figura 11, C-D).

Considerando solo i pazienti nella popolazione di sicurezza LEN o randomizzati a OBS, l'incidenza cumulativa di qualsiasi SM a 60 mesi è 9.4 (3.1-15.6) nella popolazione di sicurezza LEN rispetto a 4.5 (0.1-8.8) nel braccio OBS (HR aggiustato per MIPI 1.98 [IC 95%: 0.67-5.87], $p = 0.219$).

FIGURA 11: tutte le SM nell'intera popolazione (A); tutte le SM secondo LEN e OBS (B); tumori solidi secondo LEN e OBS (C); Sindrome Mielodisplastica secondaria o Leucemia Mieloide Acuta secondo LEN o OBS (D).

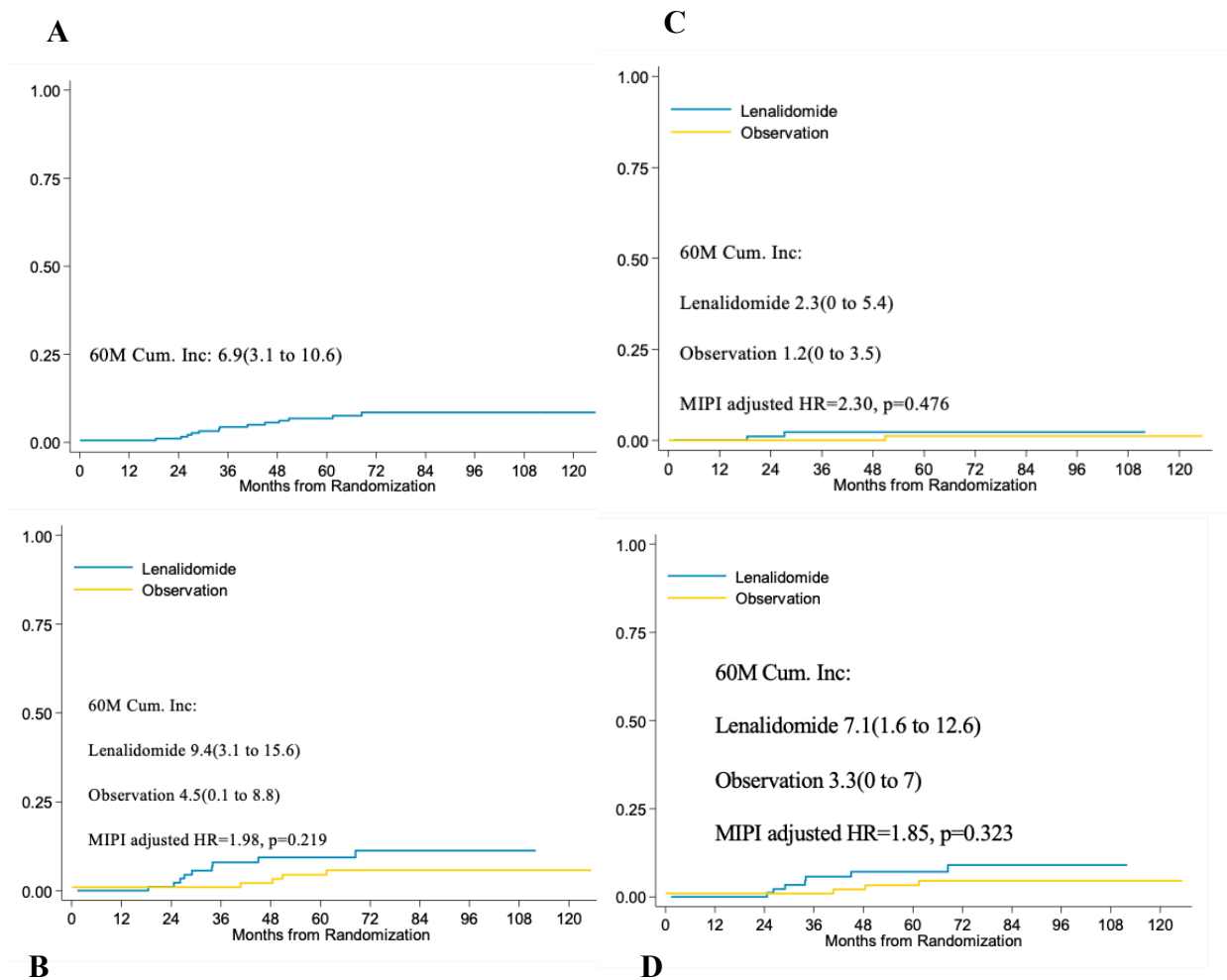


TABELLA 7: SM

SM	LEN	OBS
Tumori solidi	6 (6%)	3 (3%)
MDS/AML	3 (3%)	2 (1%)
Non melanoma skin cancer	1	0

4.2 Risultati dell'analisi MRD

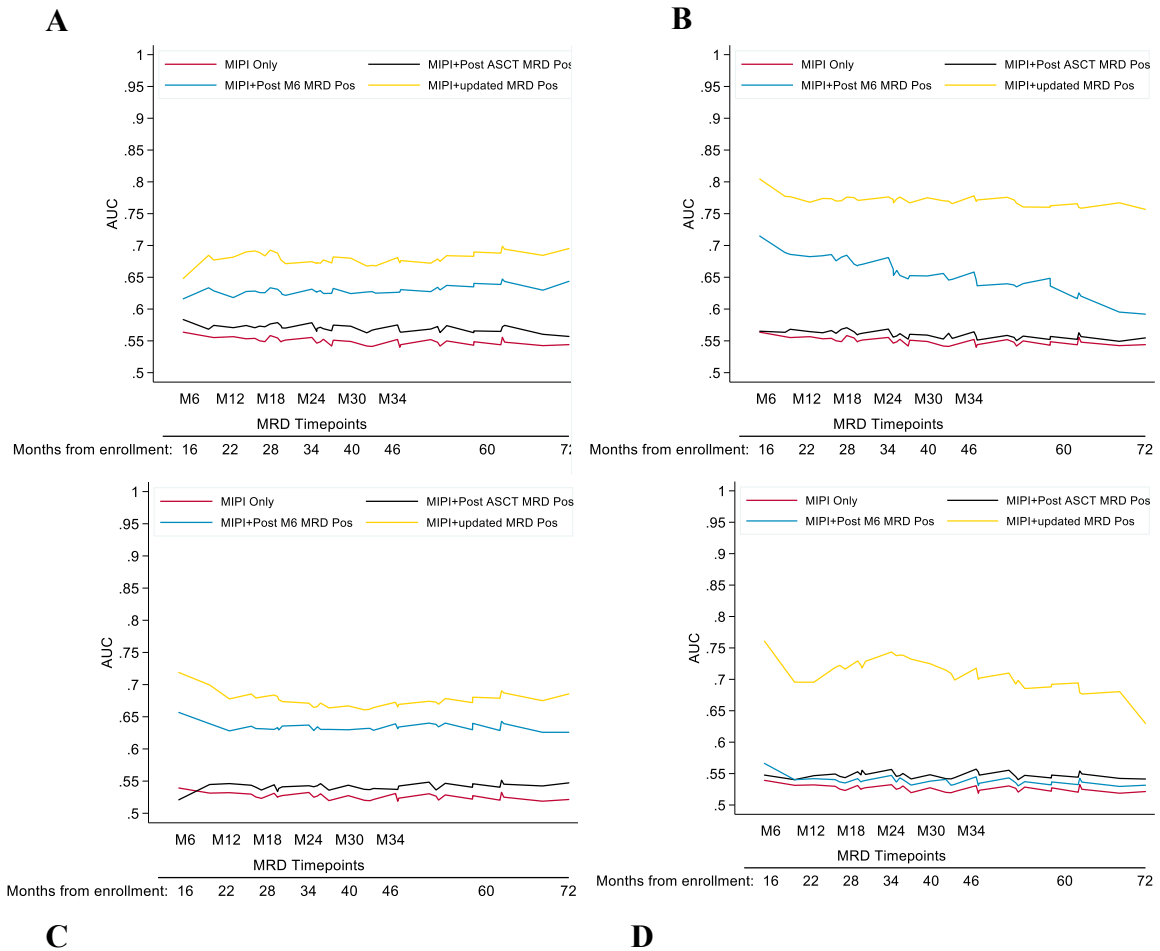
Dal 2010 al 2015, 300 pazienti sono stati arruolati nello studio e come precedentemente riportato più del 99% dei campioni sono stati centralizzati con successo nel laboratorio MRD. Al momento dell'analisi attuale, sono stati raccolti 1184 campioni di midollo osseo (MO) e 1170 campioni di sangue periferico (SP) durante la fase di induzione/consolidamento e ogni 6 mesi durante il follow-up (da M6 a M36). Successivamente, sono state eseguiti 824 esami di midollo osseo e 799 esami di sangue periferico.

La rilevazione di un marcatore molecolare adatto per MRD è stata possibile in 250 su 300 (83%) casi.

4.2.1 Valore predittivo dell'analisi MRD mediante confronto di tecniche, tessuti, marcatori e punti temporali

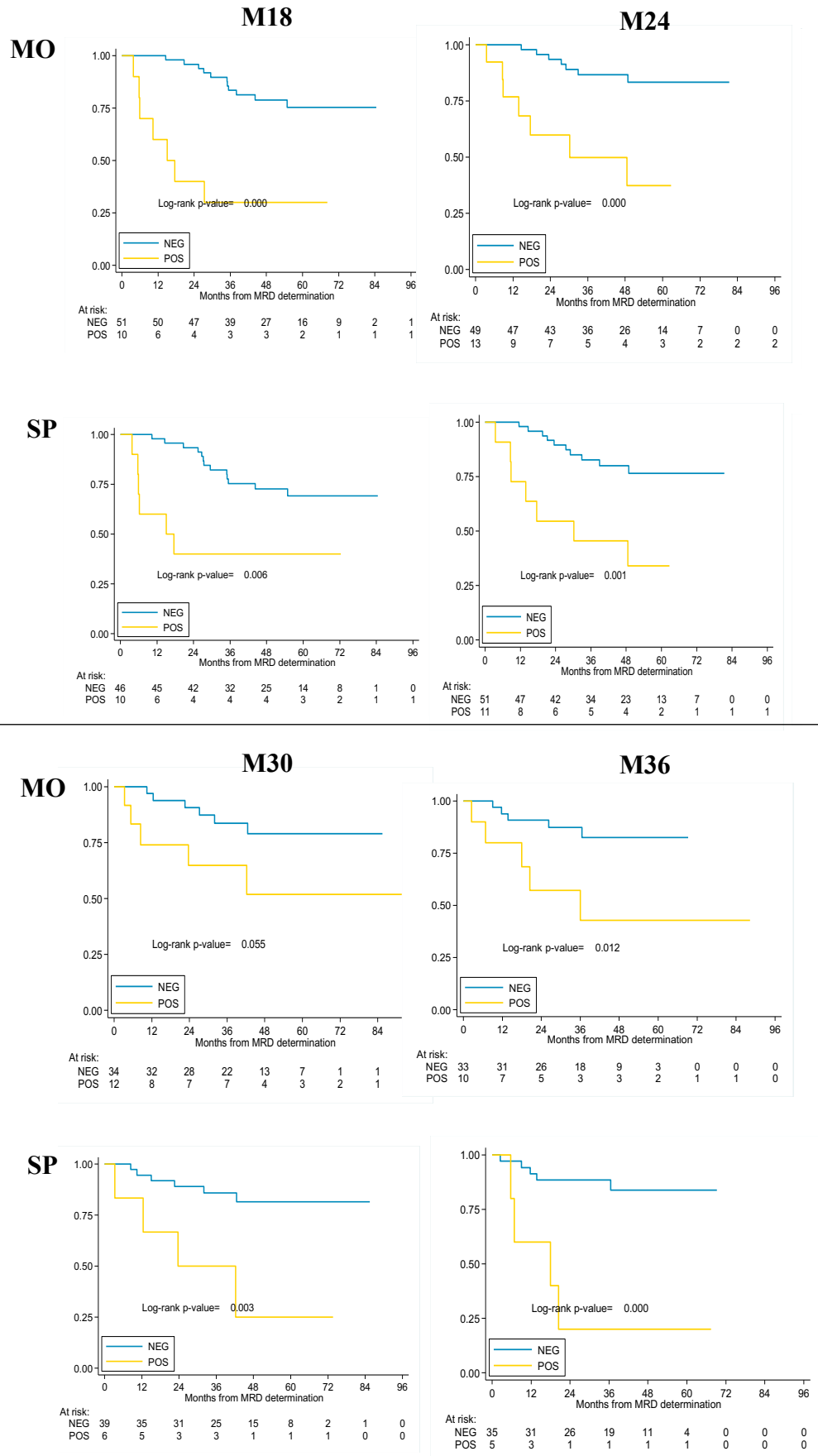
È stata eseguita un'analisi sistematica confrontando le previsioni di outcome utilizzando un approccio covariato variabile nel tempo, aggiustato per il punteggio MIPI del paziente. Come precedentemente riportato, il rischio medio di progressione nel periodo di follow-up dopo un risultato positivo della MRD tramite RQ-PCR è risultato più alto rispetto a quello dopo un risultato positivo della nested-PCR (HR nel MO 4.17 vs 2.40, rispettivamente), così come nel SP (HR mediante RQ-PCR, 2.64 vs 1.91, rispettivamente). Il rischio medio di progressione nel periodo di follow-up dopo un risultato MRD positivo mediante RQ-PCR, inoltre, si è dimostrato superiore nel MO rispetto al SP (HR mediante RQ-PCR 4.17 vs 2.64, rispettivamente) (*figura 12*).

FIGURA 12: variabilità temporale dell'Area Sotto la Curva (AUC) del Tempo alla Progressione (TTP) nel midollo osseo con nested-PCR (A) e con RQ-PCR (B) e nel sangue periferico con nested-PCR (C) e con RQ-PCR (D)



Per quanto riguarda il valore predittivo di differenti punti temporali tardivi nell'analisi del landmark, abbiamo riscontrato che il rischio di recidiva aumentava gradualmente insieme alla persistenza della positività MRD sia nel MO che nel SP mediante RQ-PCR durante la terapia. Come esempio del valore predittivo dell'analisi della MRD tramite RQ-PCR in diversi tessuti a diversi punti temporali, alcuni esemplificativi grafici di Kaplan-Meier sono mostrati in *figura 13*.

FIGURA 13: impatto della MRD sul TTP, misurato tramite RQ-PCR nel midollo osseo (MO) e nel sangue periferico (SP) a M18, M24, M30 e M36.



4.2.2 Modello cinetico MRD

Poiché nessun singolo punto temporale potrebbe fornire un ritratto completo dell'intera storia MRD di ciascun paziente, abbiamo considerato contemporaneamente i risultati di più punti temporali consecutivi, anziché concentrarci sull'analisi di ciascun punto temporale. Come precedentemente pubblicato, il follow-up a lungo termine ha confermato una stabilità persistente nel tempo dei modelli cinetici basati sull'accumulo di risultati negativi MRD. Il rischio di TTP sembra diminuire nel tempo, in base all'accumulo di risultati MRD-negativi, indipendentemente dal singolo punto temporale considerato. La presenza di 2 o 3 risultati consecutivi MRD-negativi conferisce, infatti, un rischio significativamente ridotto di recidiva, affinando la stratificazione del rischio di negatività MRD a un singolo punto temporale.

Nello specifico, con tre risultati MRD-negativi nel MO, l'HR per il TTP rispetto a MRD-positivo era 0.13 (0.07-0.24), mentre era 0.19 (0.10-0.34) con tre risultati MRD-negativi nel SP.

Inoltre, gli stessi parametri sono risultati predittivi per l'OS con un HR di 0.35 (0.16-0.73) per il MO e di 0.42 (0.19-0.90) per il SP.

TABELLA 8: analisi del TTP secondo i risultati di negatività cumulativa con RQ-PCR nel midollo osseo (MO) e nel sangue periferico (SP)

TTP	MO			SP		
	HR	IC95%	p	HR	IC95%	p
Positivo (ref)	1	-	-	1	-	-
1 negatività cumulativa	0.50	0.27, 0.95	0.036	0.89	0.48, 1.64	0.711
2 negatività cumulative	0.40	0.21, 0.78	0.007	0.65	0.36, 1.16	0.144
3 negatività cumulative	0.13	0.07, 0.24	<0.001	0.19	0.10, 0.34	<0.001

TABELLA 9: analisi dell'OS secondo i risultati di negatività cumulativa con RQ-PCR nel midollo osseo (MO) e nel sangue periferico (SP)

TTP	MO			SP		
	HR	IC95%	p	HR	IC95%	p
Positivo (ref)	1	-	-	1	-	-
1 negatività cumulativa	1.13	0.51, 2.50	0.766	0.74	0.31, 1.76	0.493
2 negatività cumulative	0.47	0.17, 1.25	0.129	0.96	0.45, 2.02	0.909
3 negatività cumulative	0.35	0.16, 0.73	0.005	0.42	0.19, 0.90	0.025

5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Lo studio di fase III FIL MCL0208 ha confrontato l'utilizzo di *lenalidomide* (LEN) per due anni con l'osservazione (OBS) dopo il trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) in pazienti giovani (<65 anni) con linfoma mantellare (MCL) non precedentemente trattato (62). In questa Tesi forniamo i risultati a lungo termine di questo trial, mostrando, a un follow-up mediano (mFU) di 74 mesi dalla randomizzazione, una PFS a 72 mesi del 55% (44-65) nel gruppo LEN rispetto al 50% (39-60) ($p = 0.175$) nel gruppo OBS.

Questi risultati a lungo termine differiscono sostanzialmente dall'analisi dell'endpoint primario pianificato, dove, a un mFU di 38 mesi dalla randomizzazione, LEN aveva mostrato superiorità in termini di Progression-Free Survival (PFS) senza benefici in termini di Overall Survival (OS).

Nello specifico, andando a valutare il disegno del trattamento, il nostro studio ha confermato che lo schema *Rituximab-High-Dose Sequential* (R-HDS) è efficace nella pratica clinica. Il protocollo R-HDS nel MCL è un approccio terapeutico intensivo, che combina la somministrazione di alte dosi di chemioterapia con l'anticorpo monoclonale *rituximab* per massimizzare l'efficacia terapeutica. Questo schema prevede l'induzione con *rituximab* e chemioterapia ad alte dosi, seguita dal condizionamento con radio-chemioterapia mieloablativa e ASCT e, infine, il consolidamento con *rituximab*.

Nel 1996 lo European MCL Network ha effettuato un confronto tra CHOP seguito da radio-chemioterapia mieloablativa e ASCT versus mantenimento con $IFN\alpha$ nei pazienti di età inferiore ai 65 anni al fine di valutare l'impatto dell'ASCT. I pazienti nel braccio ASCT hanno avuto una PFS significativamente più lunga, anche se la sopravvivenza a 3 anni non è stata significativamente superiore (61). Tuttavia, in un'analisi successiva, la mediana della sopravvivenza complessiva è risultata superiore anche nel braccio ASCT dopo un follow-up mediano prolungato di 63 mesi (139). Pertanto, il trattamento con alte dosi di chemioterapia seguita da ASCT è diventato lo standard di cura per i pazienti più giovani affetti da MCL. Tuttavia, le continue recidive e l'assenza di remissione molecolare (MR) hanno posto dei dubbi sul potenziale curativo di tale trattamento (140,141). La successiva aggiunta di *rituximab* e *citarabina* ad alte dosi nei programmi di ASCT ha portato una citoriduzione senza precedenti, rendendo la MR un obiettivo raggiungibile nei pazienti affetti da MCL. Nel 2003, Massimo Gianni et al. hanno evidenziato una MR in 19 dei 20 pazienti che hanno ricevuto R-HDS, insieme a tassi positivi di Event-Free Survival (EFS) e OS a 4 anni (79% e 89%, rispettivamente) (36). Risultati comparabili sono stati riportati in uno studio di fase II

multicentrico del Nordic Lymphoma Group (46). Nel 2004 lo European MCL Network ha avviato lo studio di fase III MCL Younger, confrontando un'induzione convenzionale con R-CHOP con un'induzione alternata di 3 cicli di R-CHOP e R-DHAP, entrambe seguite da consolidamento mieloablativo, TBI e ASCT. I risultati hanno mostrato che il braccio R-CHOP/R-DHAP ha portato a un significativo miglioramento nella mediana di Time to Treatment Failure (TTF) e OS (101). Pertanto, l'ASCT è attualmente considerato lo standard terapeutico per i pazienti più giovani affetti da MCL, come indicato dalle linee guida internazionali (5), nonché da un recente consensus dello European MCL Network e della European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) (142).

Nonostante gli alti tassi di risposta e i vantaggi in termini di sopravvivenza a lungo termine, nella pratica clinica odierna, tale schema si dimostra complesso e con un rischio aumentato di tossicità, definendosi come poco applicabile sia in termini di rischio-beneficio per i pazienti, sia in termini di spesa economica per le istituzioni. Inoltre, è stato documentato un rischio associato di sviluppare tumori secondari, tra i quali neoplasie ematologiche, come la leucemia mieloide acuta (LMA) e le sindromi mielodisplastiche (MDS) (143). Pertanto, un monitoraggio a lungo termine per la diagnosi precoce e per la gestione dei tumori secondari in pazienti sottoposti a trattamenti con alte dosi può risultare cruciale.

Altro capitolo molto dibattuto nella piattaforma terapeutica del MCL è quello legato all'utilizzo di un mantenimento. MCL0208 è stato il secondo studio a dimostrare il beneficio dell'aggiunta di un regime di mantenimento dopo ASCT in MCL. Nello schema MCL0208, la *lenalidomide* (LEN) è stata somministrata per 2 anni dopo ASCT, mostrando, a medio termine (durante il periodo di trattamento attivo), una sostanziale attività clinica, che si traduceva in una riduzione del numero degli eventi e, quindi, in un beneficio in termini di PFS. La scelta dell'agente biologico *lenalidomide* è stata mutuata da una ricca e positiva letteratura a supporto. Infatti, la *lenalidomide* è un farmaco immunomodulante che ha dimostrato un'efficacia significativa nel trattamento di varie neoplasie ematologiche, in particolare nel MCL e nel mieloma multiplo (MM).

Nel MCL, la *lenalidomide* agisce tramite la modulazione del microambiente tumorale e la stimolazione del sistema immunitario, potenziando la risposta contro le cellule tumorali. A questo proposito, ha dimostrato di essere un agente attivo nel MCL, sia in combinazione con altri farmaci, che come terapia singola. Numerosi studi hanno evidenziato il suo ruolo nel migliorare le risposte terapeutiche nei pazienti con MCL, inclusi quelli con malattia refrattaria o recidivante. In tal senso, lo studio MCL-001 (NHL-003) ha valutato l'efficacia e la sicurezza

della *lenalidomide* in pazienti con MCL recidivante o refrattario, mostrando un tasso di risposta globale del 35%, con risposte complete nel 12% dei pazienti e risposte parziali nel 23% (144); lo studio MCL-002 (SPRINT) ha confrontato la *lenalidomide* con i vari trattamenti standard in pazienti con MCL recidivante o refrattario, mostrando un miglioramento significativo della PFS rispetto alle terapie standard (145); infine, lo studio CALGB 50403 ha valutato la combinazione *lenalidomide* e *rituximab* in pazienti con MCL, mostrando un tasso di risposta globale del 92%, con risposta completa nel 64% dei pazienti (146).

Nello schema MCL0208, LEN è stata somministrata per 2 anni dopo R-HDS e consolidamento con ASCT in pazienti adulti con MCL, mostrando, a medio termine, un beneficio in termini di PFS. Questo dato si è poi tradotto in un confinamento del beneficio solo al periodo di attivo trattamento, con un aumento degli eventi di PFS una volta interrotta LEN. Infatti, si è osservato un vantaggio in termini di PFS a favore di LEN fino a 36 e 42 mesi (HR 0.58, 0.33-1.00; $p = 0.047$ e HR 0.57, 0.33-0.96; $p = 0.0314$, rispettivamente), con una successiva diminuzione del beneficio di LEN nel follow-up successivo dopo 36 e 42 mesi (rispettivamente HR 1.07, 0.58-1.96; $p = 0.83$ e HR 1.21, 0.62-2.35; $p = 0.57$).

Una considerazione aggiuntiva viene dall'esperienza nell'utilizzo della *lenalidomide* nel MM. I primi studi che ne hanno valutato l'utilizzo hanno mostrato un prolungamento della PFS e un miglioramento dell'OS se assunta fino a progressione. Lo studio CALGB 100104, infatti, ha dimostrato che la *lenalidomide* nel mantenimento post-ASCT prolunga significativamente la PFS nei pazienti con mieloma multiplo (147) e lo studio IFM 2005-02 ha confermato i benefici della *lenalidomide* nel mantenimento in termini di PFS e suggerito un potenziale miglioramento della OS (148). Questi dati potrebbero, quindi, suggerire una rimodulazione della schedula utilizzata in MCL0208. Tuttavia, le crescenti evidenze di iatrogenicità del trattamento con *lenalidomide* tendono a ridurre un possibile suo utilizzo futuro e suggeriscono la necessità di ricerca di nuovi potenziali target farmacologici.

Lo studio LYMA ha dimostrato che il mantenimento con *rituximab* dopo ASCT può migliorare significativamente gli esiti per i pazienti con MCL. Questi risultati hanno suggerito che il *rituximab* dovrebbe essere considerato una componente standard del trattamento post-trapianto per i pazienti con MCL. Tale studio ha riportato, con un mFU dalla randomizzazione di 7 anni, una PFS stimata a 7 anni del 78.5% (IC 95%: 69.9-85.0%) contro il 47.4% (IC 95%: 37.9-56.3%) per RM e OBS rispettivamente ($p < .0001$). Il trattamento con *rituximab*, inoltre, è stato generalmente ben tollerato, con un profilo di sicurezza in linea con le aspettative per questo farmaco (45). L'uso di *rituximab* di mantenimento ha stabilito un nuovo standard di cura

per i pazienti con MCL, offrendo una possibilità di controllo della malattia a lungo termine. Lo studio LYMA, quindi, rappresenta un passo significativo nella gestione del MCL, fornendo evidenze solide a supporto dell'uso del *rituximab* come terapia di mantenimento e migliorando le prospettive a lungo termine per i pazienti affetti da questa malattia.

Recentemente, sono stati pubblicati i risultati del trial MCL-R2 per pazienti anziani. Il trial MCL-R2 è uno studio clinico che ha valutato l'efficacia e la sicurezza della combinazione di *rituximab* e *lenalidomide* (R2) nella terapia del linfoma mantellare. Questo studio rappresenta un'importante valutazione dei trattamenti non chemioterapici per questa malattia, offrendo nuove importanti prospettive. Dopo un follow-up mediano di 4.2 anni dalla randomizzazione per il mantenimento, i pazienti nel braccio di mantenimento R2 hanno ottenuto un significativo miglioramento in termini di PFS rispetto a R da solo. La PFS a 4 anni è stata del 60.9% nel braccio R2 contro il 42.9% nel braccio R ($p = 0.0002$). Gli eventi avversi erano più pronunciati nel braccio di mantenimento R2 con ricorrenti (>5%) eventi avversi di grado >3: neutropenia (50.8% contro 19.2%), infezione del tratto respiratorio (6.3% contro 0.8%) e cancro della pelle (5.9% contro 3.2%) (42). Il trial MCL-R2 rappresenta, in questo senso, un importante avanzamento nel trattamento del linfoma mantellare, dimostrando che la combinazione di *rituximab* e *lenalidomide* può offrire un'efficacia significativa rispetto ai trattamenti tradizionali. Il mantenimento combinato R2, infatti, ha prolungato notevolmente la PFS rispetto al solo *rituximab*; tuttavia, non è stata osservata alcuna differenza in OS. Queste osservazioni suggeriscono la necessità di individuare agenti alternativi per migliorare la sopravvivenza nei pazienti con MCL.

Il confronto con il nostro studio suggerisce che il beneficio di *lenalidomide* è massimizzato dal trattamento concomitante con un anticorpo monoclonale, possibilmente attraverso effetti sinergici. In generale, tutti questi risultati sottolineano il ruolo critico del mantenimento per garantire un controllo efficace nel MCL. Questo è stato ulteriormente enfatizzato dai risultati del trial TRIANGLE, uno studio randomizzato, in aperto, a 3 bracci, che valuta il ruolo dell'aggiunta di *ibrutinib* al trattamento standard con 2 anni di mantenimento (braccio A+I) rispetto al gruppo di riferimento (braccio A) e a un trattamento contenente *ibrutinib* senza ASCT (braccio I). Dopo un follow-up mediano di 31 mesi, gli autori hanno riportato una PFS a 3 anni del 72% (A) contro l'86% (I; $p = 0,9979$, HR: 1,77) con il braccio A+I superiore ad A in termini di PFS, con una PFS a 3 anni dell'88% (A+I) contro il 72% (A; $p = 0,0008$, HR: 0,52). Il monitoraggio statistico per il confronto della PFS di A+I contro I è

ancora in corso. L'OS a 3 anni è dell'86% in A, del 91% in A+I e del 92% in I. Il trial TRIANGLE rappresenta un passo avanti significativo nella gestione del linfoma mantellare (42). L'aggiunta di *ibrutinib* nella terapia di prima linea ha il potenziale di migliorare significativamente gli esiti per i pazienti, offrendo un'opzione terapeutica efficace e tollerabile. Questo studio apre nuove prospettive per il trattamento del MCL, ponendo le basi per ulteriori ricerche e innovazioni terapeutiche in questo campo e probabilmente la fine dell'era del ASCT nel MCL.

Risultati affini, inoltre, sono stati riportati in un contesto di pazienti non idonei al trapianto. Il trial SHINE, che confronta l'associazione di *ibrutinib* in combinazione con *bendamustina* e *rituximab* (BR) in pazienti anziani con MCL non trattato in precedenza, ha stabilito la superiorità del braccio contenente *ibrutinib* in termini di PFS. Infatti, con un follow-up mediano di 84.7 mesi, la PFS mediana nel braccio contenente *ibrutinib* era di 80.6 mesi, confermando che *ibrutinib* è una scelta di mantenimento altamente efficace (64).

Una delle riflessioni etiche più significative associate al trattamento con *lenalidomide* è l'insorgenza di tumori secondari (Secondary Malignancies, SM). L'incidenza cumulativa di SM (inclusi i tumori della pelle) a 7 anni nella nostra coorte è stata di 9.4 (3.1 a 15.6) nella popolazione di sicurezza LEN contro 4.5 (0.1 a 8.8) nel braccio OBS ($p = 0.219$). Questi risultati non sono statisticamente significativi, ma sollevano comunque qualche preoccupazione e un ulteriore follow-up sarà di aiuto. Nel trial MCL Younger, l'incidenza cumulativa di tumori secondari era del 4,8% nel gruppo trattato con R-CHOP + DHAP e del 4,3% nel gruppo trattato con R-CHOP (101). È difficile trarre conclusioni sul rischio di sviluppare SM secondo diversi regimi terapeutici; tuttavia, riconosciamo che questo tema meriti studi specifici in MCL, infatti è importante continuare a monitorare attentamente questi pazienti nel lungo termine per comprendere meglio il rischio e l'incidenza di tumori secondari associati ai diversi regimi terapeutici.

Oltre a fornire importanti evidenze cliniche, il nostro trial ha incluso anche un ampio sottostudio molecolare riguardante l'utilizzo della Minimal Residual Disease (MRD), i cui risultati hanno evidenziato l'alto valore prognostico dell'analisi MRD sia puntuale, che cinetica.

I risultati a lungo termine hanno confermato un aumento persistente del rischio di progressione dopo un risultato MRD positivo e una stabilità persistente nel tempo dei modelli cinetici basati sull'accumulo di risultati MRD negativi.

Infatti, il rischio medio di progressione nel periodo di follow-up dopo un risultato MRD positivo mediante RQ-PCR si è dimostrato superiore nel MO rispetto al SP (HR mediante RQ-PCR 4.17 vs 2.64, rispettivamente). Per quanto riguarda il valore predittivo di differenti punti temporali tardivi, abbiamo riscontrato, inoltre, che il rischio di recidiva aumentava gradualmente insieme alla persistenza della positività MRD, sia nel MO che nel SP mediante RQ-PCR durante la terapia. Infine, poiché nessun singolo punto temporale potrebbe fornire un ritratto completo dell'intera storia MRD di ciascun paziente, abbiamo considerato contemporaneamente i risultati di più punti temporali consecutivi, anziché concentrarci sull'analisi di ciascun punto temporale. Come precedentemente pubblicato, il follow-up a lungo termine ha confermato una stabilità persistente nel tempo dei modelli cinetici basati sull'accumulo di risultati negativi MRD. Il rischio di TTP sembra diminuire nel tempo, in base all'accumulo di risultati MRD-negativi, indipendentemente dal singolo punto temporale considerato. La presenza di 2 o 3 risultati consecutivi MRD-negativi conferisce, infatti, un rischio significativamente ridotto di recidiva, affinando la stratificazione del rischio di negatività MRD a un singolo punto temporale. Nello specifico, con tre risultati MRD-negativi nel MO, l'HR per il TTP rispetto a MRD-positivo era 0.13 (0.07-0.24), mentre era 0.19 (0.10-0.34) con tre risultati MRD-negativi nel SP. Inoltre, gli stessi parametri sono risultati predittivi per l'OS, con un HR di 0.35 (0.16-0.73) per il MO e di 0.42 (0.19-0.90) per il SP.

Questi risultati MRD sottolineano ulteriormente il valore predittivo di questo strumento, in particolare nel contesto dei modelli cinetici. I risultati confermano il forte ruolo prognostico di MRD, suggerendo che la de-escalation del trattamento per i pazienti MRD-negativi dovrebbe essere esplorata in futuri trial clinici.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Gatter K, et al. Mantle Cell Lymphoma A Proposal for Unification of Morphologic, Immunologic, and Molecular Data. *Am J Surg Pathol*. luglio 1992;16(7):637–40.
2. Weisenburger DD, Kim H, Rappaport H. Mantle-zone lymphoma: A follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma. *Cancer*. 1 aprile 1982;49(7):1429–38.
3. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissue. 4^a ed. Bosman FT JELSOH, curatore. Vol. 2.2. IARC; 2017.
4. Giuliani N, Olivieri A. *Ematologia*. Idelson - Gnocchi, curatore. 2020.
5. Dreyling M, Geisler C, Hermine O, Kluin-Nelemans HC, Le Gouill S, Rule S, et al. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. settembre 2014;25:iii83–92.
6. Orphanet. <https://www.orpha.net/it/disease>. Linfoma Mantellare.
7. Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, et al. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the *European MCL Network*. *Br J Haematol*. 20 ottobre 2005;131(1):29–38.
8. Naeim F. *Atlas of Hematopathology*. Elsevier; 2013.
9. Fernández V, Salameo O, Espinet B, Solé F, Royo C, Navarro A, et al. Genomic and Gene Expression Profiling Defines Indolent Forms of Mantle Cell Lymphoma. *Cancer Res*. 15 febbraio 2010;70(4):1408–18.
10. Hoster E, Rosenwald A, Berger F, Bernd HW, Hartmann S, Loddenkemper C, et al. Prognostic Value of Ki-67 Index, Cytology, and Growth Pattern in Mantle-Cell Lymphoma: Results From Randomized Trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Journal of Clinical Oncology*. 20 aprile 2016;34(12):1386–94.
11. Jares P, Colomer D, Campo E. Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics. *Nat Rev Cancer*. ottobre 2007;7(10):750–62.
12. Fernández V, Hartmann E, Ott G, Campo E, Rosenwald A. Pathogenesis of Mantle-Cell Lymphoma: All Oncogenic Roads Lead to Dysregulation of Cell Cycle and DNA Damage Response Pathways. *Journal of Clinical Oncology*. 10 settembre 2005;23(26):6364–9.

13. Fu K. Cyclin D1-negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling. *Blood*. 15 dicembre 2005;106(13):4315–21.
14. Jares P, Colomer D, Campo E. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Investigation*. 1 ottobre 2012;122(10):3416–23.
15. Young RM, Staudt LM. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov*. 1 marzo 2013;12(3):229–43.
16. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 8 agosto 2013;369(6):507–16.
17. Beà S, Valdés-Mas R, Navarro A, Salaverria I, Martín-García D, Jares P, et al. Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 5 novembre 2013;110(45):18250–5.
18. Zhang J, Jima D, Moffitt AB, Liu Q, Czader M, Hsi ED, et al. The genomic landscape of mantle cell lymphoma is related to the epigenetically determined chromatin state of normal B cells. *Blood*. 8 maggio 2014;123(19):2988–96.
19. Jain P, Wang ML. Mantle cell lymphoma in 2022—A comprehensive update on molecular pathogenesis, risk stratification, clinical approach, and current and novel treatments. *Am J Hematol*. 5 maggio 2022;97(5):638–56.
20. Albero R, Enjuanes A, Demajo S, Castellano G, Pinyol M, García N, et al. Cyclin D1 overexpression induces global transcriptional downregulation in lymphoid neoplasms. *Journal of Clinical Investigation*. 31 agosto 2018;128(9):4132–47.
21. Pinyol M, Hernandez L, Cazorla M, Balbín M, Jares P, Fernandez PL, et al. Deletions and loss of expression of p16INK4a and p21Waf1 genes are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*. 1 gennaio 1997;89(1):272–80.
22. Hernández L, Beà S, Pinyol M, Ott G, Katzenberger T, Rosenwald A, et al. CDK4 and MDM2 gene alterations mainly occur in highly proliferative and aggressive mantle cell lymphomas with wild-type INK4a/ARF locus. *Cancer Res*. 15 marzo 2005;65(6):2199–206.
23. Eskelund CW, Dahl C, Hansen JW, Westman M, Kolstad A, Pedersen LB, et al. TP53 mutations identify younger mantle cell lymphoma patients who do not benefit from intensive chemoimmunotherapy. *Blood*. 26 ottobre 2017;130(17):1903–10.
24. Kridel R, Meissner B, Rogic S, Boyle M, Telenius A, Woolcock B, et al. Whole transcriptome sequencing reveals recurrent NOTCH1 mutations in mantle cell lymphoma. *Blood*. 1 marzo 2012;119(9):1963–71.

25. Yang P, Zhang W, Wang J, Liu Y, An R, Jing H. Genomic landscape and prognostic analysis of mantle cell lymphoma. *Cancer Gene Ther.* giugno 2018;25(5–6):129–40.
26. Herrmann A, Hoster E, Zwingers T, Brittinger G, Engelhard M, Meusers P, et al. Improvement of overall survival in advanced stage mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol.* 1 febbraio 2009;27(4):511–8.
27. Aukema SM, Hoster E, Rosenwald A, Canoni D, Delfau-Larue MH, Rymkiewicz G, et al. Expression of TP53 is associated with the outcome of MCL independent of MIPI and Ki-67 in trials of the European MCL Network. *Blood.* 25 gennaio 2018;131(4):417–20.
28. Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, et al. A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood.* 15 gennaio 2008;111(2):558–65.
29. Hoster E, Klapper W, Hermine O, Kluin-Nelemans HC, Walewski J, van Hoof A, et al. Confirmation of the mantle-cell lymphoma International Prognostic Index in randomized trials of the European Mantle-Cell Lymphoma Network. *J Clin Oncol.* 1 maggio 2014;32(13):1338–46.
30. Harrison TR. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* Casa Editrice Ambrosiana, curatore. 2021.
31. Wang ML, Lee H, Chuang H, Wagner-Bartak N, Hagemester F, Westin J, et al. Ibrutinib in combination with rituximab in relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a single-centre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* gennaio 2016;17(1):48–56.
32. Rauert-Wunderlich H, Mottok A, Scott DW, Rimsza LM, Ott G, Klapper W, et al. Validation of the MCL35 gene expression proliferation assay in randomized trials of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Br J Haematol.* febbraio 2019;184(4):616–24.
33. Scott DW, Abrisqueta P, Wright GW, Slack GW, Mottok A, Villa D, et al. New Molecular Assay for the Proliferation Signature in Mantle Cell Lymphoma Applicable to Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Biopsies. *J Clin Oncol.* 20 maggio 2017;35(15):1668–77.
34. Clot G, Jares P, Giné E, Navarro A, Royo C, Pinyol M, et al. A gene signature that distinguishes conventional and leukemic nonnodal mantle cell lymphoma helps predict outcome. *Blood.* 26 luglio 2018;132(4):413–22.
35. Hill HA, Qi X, Jain P, Nomie K, Wang Y, Zhou S, et al. Genetic mutations and features of mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv.* 14 luglio 2020;4(13):2927–38.

36. Jain P, Kanagal-Shamanna R, Zhang S, Ahmed M, Ghorab A, Zhang L, et al. Long-term outcomes and mutation profiling of patients with mantle cell lymphoma (MCL) who discontinued ibrutinib. *Br J Haematol.* novembre 2018;183(4):578–87.
37. Milpied N, Dreyling M. *Mantle Cell Lymphoma.* 2022.
38. Eskelund CW, Dimopoulos K, Kolstad A, Glimelius I, Råty R, Gjerdrum LMR, et al. Detailed Long-Term Follow-Up of Patients Who Relapsed After the Nordic Mantle Cell Lymphoma Trials: MCL2 and MCL3. *Hemasphere.* gennaio 2021;5(1):e510.
39. AIOM (Associazione Italiana di Oncologia Medica). https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2018/11/2018_LG_AIOM_Linfomi.pdf. 2018. Linee Guida AIOM - Linfomi.
40. Romaguera JE, Medeiros LJ, Hagemester FB, Fayad LE, Rodriguez MA, Pro B, et al. Frequency of gastrointestinal involvement and its clinical significance in mantle cell lymphoma. *Cancer.* 1 febbraio 2003;97(3):586–91.
41. Cheah CY, George A, Giné E, Chiappella A, Kluin-Nelemans HC, Jurczak W, et al. Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma: clinical features, prognostic factors and outcomes from the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Ann Oncol.* agosto 2013;24(8):2119–23.
42. Dreyling M, Ladetto M, Doorduijn JK, Gine E, Jerkeman M, Mey U, et al. Triangle: Autologous Transplantation after a Rituximab/Ibrutinib/ara-c Containing Induction in Generalized Mantle Cell Lymphoma - a Randomized European MCL Network Trial. *Blood.* 13 novembre 2019;134(Supplement_1):2816–2816.
43. Dabaja BS, Zelenetz AD, Ng AK, Tsang RW, Qi S, Allen PK, et al. Early-stage mantle cell lymphoma: a retrospective analysis from the International Lymphoma Radiation Oncology Group (ILROG). *Ann Oncol.* 1 settembre 2017;28(9):2185–90.
44. Maddocks K. Update on mantle cell lymphoma. *Blood.* 18 ottobre 2018;132(16):1647–56.
45. Le Gouill S, Thieblemont C, Oberic L, Moreau A, Bouabdallah K, Dartigeas C, et al. Rituximab after Autologous Stem-Cell Transplantation in Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 28 settembre 2017;377(13):1250–60.
46. Geisler CH, Kolstad A, Laurell A, Andersen NS, Pedersen LB, Jerkeman M, et al. Long-term progression-free survival of mantle cell lymphoma after intensive front-line immunochemotherapy with in vivo-purged stem cell rescue: a nonrandomized phase 2 multicenter study by the Nordic Lymphoma Group. *Blood.* 1 ottobre 2008;112(7):2687–93.

47. Martin P, Chadburn A, Christos P, Weil K, Furman RR, Ruan J, et al. Outcome of deferred initial therapy in mantle-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 10 marzo 2009;27(8):1209–13.
48. Kumar A, Ying Z, Alperovich A, Dogan A, Hamlin P, Moskowitz C, et al. Clinical presentation determines selection of patients for initial observation in mantle cell lymphoma. *Haematologica*. aprile 2019;104(4):e163–6.
49. Rummel MJ, Niederle N, Maschmeyer G, Banat GA, von Grünhagen U, Losem C, et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*. 6 aprile 2013;381(9873):1203–10.
50. Flinn IW, van der Jagt R, Kahl BS, Wood P, Hawkins TE, Macdonald D, et al. Randomized trial of bendamustine-rituximab or R-CHOP/R-CVP in first-line treatment of indolent NHL or MCL: the BRIGHT study. *Blood*. 8 maggio 2014;123(19):2944–52.
51. Robak T, Jin J, Pylypenko H, Verhoef G, Siritanaratkul N, Drach J, et al. Frontline bortezomib, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (VR-CAP) versus rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) in transplantation-ineligible patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma: final overall survival results of a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol*. novembre 2018;19(11):1449–58.
52. Wang ML, Blum KA, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, et al. Long-term follow-up of MCL patients treated with single-agent ibrutinib: updated safety and efficacy results. *Blood*. 6 agosto 2015;126(6):739–45.
53. Wang M, Rule S, Zinzani PL, Goy A, Casasnovas O, Smith SD, et al. Acalabrutinib in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (ACE-LY-004): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*. 17 febbraio 2018;391(10121):659–67.
54. Dreyling M, Jurczak W, Jerkeman M, Silva RS, Rusconi C, Trneny M, et al. Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. febbraio 2016;387(10020):770–8.
55. Rule S, Jurczak W, Jerkeman M, Rusconi C, Trneny M, Offner F, et al. Ibrutinib versus temsirolimus: 3-year follow-up of patients with previously treated mantle cell lymphoma from the phase 3, international, randomized, open-label RAY study. *Leukemia*. agosto 2018;32(8):1799–803.

56. Tam CS, Opat S, Simpson D, Cull G, Munoz J, Phillips TJ, et al. Zanubrutinib for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Blood Adv.* 22 giugno 2021;5(12):2577–85.
57. Rule S, Dreyling M, Goy A, Hess G, Auer R, Kahl B, et al. Ibrutinib for the treatment of relapsed/refractory mantle cell lymphoma: extended 3.5-year follow up from a pooled analysis. *Haematologica.* maggio 2019;104(5):e211–4.
58. Delarue R, Haioun C, Ribrag V, Brice P, Delmer A, Tilly H, et al. CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood.* 3 gennaio 2013;121(1):48–53.
59. Hermine O, Hoster E, Walewski J, Bosly A, Stilgenbauer S, Thieblemont C, et al. Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Lancet.* 6 agosto 2016;388(10044):565–75.
60. Chihara D, Cheah CY, Westin JR, Fayad LE, Rodriguez MA, Hagemester FB, et al. Rituximab plus hyper-CVAD alternating with MTX/Ara-C in patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma: 15-year follow-up of a phase II study from the MD Anderson Cancer Center. *Br J Haematol.* gennaio 2016;172(1):80–8.
61. Dreyling M, Lenz G, Hoster E, Van Hoof A, Gisselbrecht C, Schmits R, et al. Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood.* 1 aprile 2005;105(7):2677–84.
62. Ladetto M, Cortelazzo S, Ferrero S, Evangelista A, Mian M, Tavarozzi R, et al. Lenalidomide maintenance after autologous haematopoietic stem-cell transplantation in mantle cell lymphoma: results of a Fondazione Italiana Linfomi (FIL) multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* gennaio 2021;8(1):e34–44.
63. Dreyling M, Doorduijn JK, Gine E, Jerkeman M, Walewski J, Hutchings M, et al. Efficacy and Safety of Ibrutinib Combined with Standard First-Line Treatment or As Substitute for Autologous Stem Cell Transplantation in Younger Patients with Mantle Cell Lymphoma: Results from the Randomized Triangle Trial By the European MCL Network. *Blood.* 15 novembre 2022;140(Supplement 1):1–3.

64. Wang ML, Jurczak W, Jerkeman M, Trotman J, Zinzani PL, Belada D, et al. Ibrutinib plus Bendamustine and Rituximab in Untreated Mantle-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 30 giugno 2022;386(26):2482–94.
65. Kluijn-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, Walewski J, Trneny M, Geisler CH, et al. Treatment of older patients with mantle-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 9 agosto 2012;367(6):520–31.
66. Visco C, Chiappella A, Nassi L, Patti C, Ferrero S, Barbero D, et al. Rituximab, bendamustine, and low-dose cytarabine as induction therapy in elderly patients with mantle cell lymphoma: a multicentre, phase 2 trial from Fondazione Italiana Linfomi. *Lancet Haematol*. gennaio 2017;4(1):e15–23.
67. Fischer L, Jiang L, Bittenbring JT, Huebel K, Schmidt C, Duell J, et al. The addition of rituximab to chemotherapy improves overall survival in mantle cell lymphoma—a pooled trials analysis. *Ann Hematol*. ottobre 2023;102(10):2791–801.
68. Lenz G, Dreyling M, Hoster E, Wörmann B, Dührsen U, Metzner B, et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol*. 20 marzo 2005;23(9):1984–92.
69. Visco C, Castegnaro S, Chiericato K, Bernardi M, Albiero E, Zanon C, et al. The cytotoxic effects of bendamustine in combination with cytarabine in mantle cell lymphoma cell lines. *Blood Cells Mol Dis*. 15 gennaio 2012;48(1):68–75.
70. Visco C, Finotto S, Zambello R, Paolini R, Menin A, Zanotti R, et al. Combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for patients with mantle-cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation. *J Clin Oncol*. 10 aprile 2013;31(11):1442–9.
71. Scheffold A, Jebaraj BMC, Stilgenbauer S. Venetoclax: Targeting BCL2 in Hematological Cancers. *Recent Results Cancer Res*. 2018;212:215–42.
72. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, et al. KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2 aprile 2020;382(14):1331–42.
73. Forstpointner R, Dreyling M, Repp R, Hermann S, Hänel A, Metzner B, et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone (FCM) significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with

- FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 15 novembre 2004;104(10):3064–71.
74. Rummel MJ, Al-Batran SE, Kim SZ, Welslau M, Hecker R, Kofahl-Krause D, et al. Bendamustine plus rituximab is effective and has a favorable toxicity profile in the treatment of mantle cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 20 maggio 2005;23(15):3383–9.
 75. Eyre TA, Walter HS, Iyengar S, Follows G, Cross M, Fox CP, et al. Efficacy of venetoclax monotherapy in patients with relapsed, refractory mantle cell lymphoma after Bruton tyrosine kinase inhibitor therapy. *Haematologica*. febbraio 2019;104(2):e68–71.
 76. Jain P, Lee HJ, Steiner RE, Hagemester FB, Samaniego F, Westin JR, et al. Frontline Treatment with Ibrutinib with Rituximab (IR) Combination Is Highly Effective in Elderly (≥ 65 years) Patients with Mantle Cell Lymphoma (MCL) - Results from a Phase II Trial. *Blood*. 13 novembre 2019;134(Supplement_1):3988–3988.
 77. Mato AR, Nabhan C, Thompson MC, Lamanna N, Brander DM, Hill B, et al. Toxicities and outcomes of 616 ibrutinib-treated patients in the United States: a real-world analysis. *Haematologica*. maggio 2018;103(5):874–9.
 78. Song Y, Zhou K, Zou D, Zhou J, Hu J, Yang H, et al. Safety and Activity of the Investigational Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Zanubrutinib (BGB-3111) in Patients with Mantle Cell Lymphoma from a Phase 2 Trial. *Blood*. 29 novembre 2018;132(Supplement 1):148–148.
 79. Wang ML, Jurczak W, Zinzani PL, Eyre TA, Cheah CY, Ujjani CS, et al. Pirtobrutinib in Covalent Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor Pretreated Mantle-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. 20 agosto 2023;41(24):3988–97.
 80. Cohen JB, Shah NN, Jurczak W, Zinzani PL, Cheah CY, Eyre TA, et al. Pirtobrutinib in Relapsed/Refractory (R/R) Mantle Cell Lymphoma (MCL) Patients with Prior cBTKi: Safety and Efficacy Including High-Risk Subgroup Analyses from the Phase 1/2 BRUIN Study. *Blood*. 28 novembre 2023;142(Supplement 1):981–981.
 81. Cheah CY, Chihara D, Romaguera JE, Fowler NH, Seymour JF, Hagemester FB, et al. Patients with mantle cell lymphoma failing ibrutinib are unlikely to respond to salvage chemotherapy and have poor outcomes. *Ann Oncol*. giugno 2015;26(6):1175–9.
 82. Rule S, Dreyling M, Goy A, Hess G, Auer R, Kahl B, et al. Outcomes in 370 patients with mantle cell lymphoma treated with ibrutinib: a pooled analysis from three open-label studies. *Br J Haematol*. novembre 2017;179(3):430–8.

83. Visco C, Di Rocco A, Evangelista A, Quaglia FM, Tisi MC, Morello L, et al. Outcomes in first relapsed-refractory younger patients with mantle cell lymphoma: results from the MANTLE-FIRST study. *Leukemia*. marzo 2021;35(3):787–95.
84. McCulloch R, Visco C, Eyre TA, Frewin R, Phillips N, Tucker DL, et al. Efficacy of R-BAC in relapsed, refractory mantle cell lymphoma post BTK inhibitor therapy. *Br J Haematol*. maggio 2020;189(4):684–8.
85. Tam CS, Anderson MA, Pott C, Agarwal R, Handunnetti S, Hicks RJ, et al. Ibrutinib plus Venetoclax for the Treatment of Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 29 marzo 2018;378(13):1211–23.
86. Hutchings M, Morschhauser F, Iacoboni G, Carlo-Stella C, Offner FC, Sureda A, et al. Glofitamab, a Novel, Bivalent CD20-Targeting T-Cell-Engaging Bispecific Antibody, Induces Durable Complete Remissions in Relapsed or Refractory B-Cell Lymphoma: A Phase I Trial. *J Clin Oncol*. 20 giugno 2021;39(18):1959–70.
87. Bannerji R, Allan JN, Arnason JE, Brown JR, Advani R, Ansell SM, et al. Odronextamab (REGN1979), a Human CD20 x CD3 Bispecific Antibody, Induces Durable, Complete Responses in Patients with Highly Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma, Including Patients Refractory to CAR T Therapy. *Blood*. 5 novembre 2020;136(Supplement 1):42–3.
88. Budde LE, Sehn LH, Assouline S, Flinn IW, Isufi I, Yoon SS, et al. Mosunetuzumab, a Full-Length Bispecific CD20/CD3 Antibody, Displays Clinical Activity in Relapsed/Refractory B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma (NHL): Interim Safety and Efficacy Results from a Phase 1 Study. *Blood*. 29 novembre 2018;132(Supplement 1):399–399.
89. Clausen MR, Lugtenburg P, Hutchings M, Johnson PWM, Linton KM, Lewis DJ, et al. Subcutaneous epcoritamab in patients with relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: Safety profile and antitumor activity. *Journal of Clinical Oncology*. 20 maggio 2021;39(15_suppl):7518–7518.
90. Budde LE, Assouline S, Sehn LH, Schuster SJ, Yoon SS, Yoon DH, et al. Single-Agent Mosunetuzumab Shows Durable Complete Responses in Patients With Relapsed or Refractory B-Cell Lymphomas: Phase I Dose-Escalation Study. *Journal of Clinical Oncology*. 10 febbraio 2022;40(5):481–91.
91. Wang L, Yang P, Zhang W, Wang J, Jing H. Clinical and Molecular Biology Analysis of Patients with Mantle Cell Lymphoma Resistant to BTK Inhibitor. *Blood*. 5 novembre 2021;138(Supplement 1):4527–4527.

92. Ferrero S, Rossi D, Rinaldi A, Brusca A, Spina V, Eskelund CW, et al. KMT2D mutations and TP53 disruptions are poor prognostic biomarkers in mantle cell lymphoma receiving high-dose therapy: a FIL study. *Haematologica*. giugno 2020;105(6):1604–12.
93. Pott C. Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: technical aspects and clinical relevance. *Semin Hematol*. luglio 2011;48(3):172–84.
94. Galimberti S, Luminari S, Ciabatti E, Grassi S, Guerrini F, Dondi A, et al. Minimal residual disease after conventional treatment significantly impacts on progression-free survival of patients with follicular lymphoma: the FIL FOLL05 trial. *Clin Cancer Res*. 15 dicembre 2014;20(24):6398–405.
95. Drandi D, Kubiczkova-Besse L, Ferrero S, Dani N, Passera R, Mantoan B, et al. Minimal Residual Disease Detection by Droplet Digital PCR in Multiple Myeloma, Mantle Cell Lymphoma, and Follicular Lymphoma: A Comparison with Real-Time PCR. *J Mol Diagn*. novembre 2015;17(6):652–60.
96. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, Ferrero S, Pepin F, Drandi D, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. giugno 2014;28(6):1299–307.
97. Böttcher S, Ritgen M, Kneba M. Flow cytometric MRD detection in selected mature B-cell malignancies. *Methods Mol Biol*. 2013;971:149–74.
98. Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, Bartram J, Boudjoghra M, Bystry V, et al. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia*. settembre 2019;33(9):2241–53.
99. Cheminant M, Derrieux C, Touzart A, Schmit S, Grenier A, Trinquand A, et al. Minimal residual disease monitoring by 8-color flow cytometry in mantle cell lymphoma: an EU-MCL and LYSA study. *Haematologica*. marzo 2016;101(3):336–45.
100. Böttcher S, Ritgen M, Buske S, Gesk S, Klapper W, Hoster E, et al. Minimal residual disease detection in mantle cell lymphoma: methods and significance of four-color flow cytometry compared to consensus IGH-polymerase chain reaction at initial staging and for follow-up examinations. *Haematologica*. aprile 2008;93(4):551–9.
101. Hermine O, Hoster E, Walewski J, Ribrag V, Brousse N, Thieblemont C, et al. Alternating Courses of 3x CHOP and 3x DHAP Plus Rituximab Followed by a High Dose ARA-C Containing Myeloablative Regimen and Autologous Stem Cell Transplantation (ASCT) Increases Overall Survival When Compared to 6 Courses of CHOP Plus Rituximab Followed by Myeloablative Radiochemotherapy and ASCT in

- Mantle Cell Lymphoma: Final Analysis of the MCL Younger Trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network (MCL net). *Blood*. 16 novembre 2012;120(21):151–151.
102. Chovancová J, Bernard T, Stehlíková O, Šálek D, Janíková A, Mayer J, et al. Detection of minimal residual disease in mantle cell lymphoma-establishment of novel eight-color flow cytometry approach. *Cytometry B Clin Cytom*. marzo 2015;88(2):92–100.
 103. Ferrero S, Drandi D, Mantoan B, Ghione P, Omedè P, Ladetto M. Minimal residual disease detection in lymphoma and multiple myeloma: impact on therapeutic paradigms. *Hematol Oncol*. dicembre 2011;29(4):167–76.
 104. Pott C, Brüggemann M, Ritgen M, van der Velden VHJ, van Dongen JJM, Kneba M. MRD Detection in B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas Using Ig Gene Rearrangements and Chromosomal Translocations as Targets for Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2019;1956:199–228.
 105. Rimokh R, Berger F, Delsol G, Digonnet I, Rouault JP, Tigaud JD, et al. Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood*. 1 aprile 1994;83(7):1871–5.
 106. Genuardi E, Klous P, Mantoan B, Drandi D, Ferrante M, Cavallo F, et al. Targeted locus amplification to detect molecular markers in mantle cell and follicular lymphoma. *Hematol Oncol*. agosto 2021;39(3):293–303.
 107. Voena C, Malnati M, Majolino I, Fagà G, Montefusco V, Farina L, et al. Detection of minimal residual disease by real-time PCR can be used as a surrogate marker to evaluate the graft-versus-myeloma effect after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. ottobre 2003;32(8):791–3.
 108. Ladetto M, Sametti S, Donovan JW, Ferrero D, Astolfi M, Mitterer M, et al. A validated real-time quantitative PCR approach shows a correlation between tumor burden and successful ex vivo purging in follicular lymphoma patients. *Exp Hematol*. febbraio 2001;29(2):183–93.
 109. Brüggemann M, Droese J, Bolz I, Lüth P, Pott C, von Neuhoff N, et al. Improved assessment of minimal residual disease in B cell malignancies using fluorogenic consensus probes for real-time quantitative PCR. *Leukemia*. agosto 2000;14(8):1419–25.
 110. van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements:

- guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. aprile 2007;21(4):604–11.
111. Andersen NS, Donovan JW, Zuckerman A, Pedersen L, Geisler C, Gribben JG. Real-time polymerase chain reaction estimation of bone marrow tumor burden using clonal immunoglobulin heavy chain gene and bcl-1/JH rearrangements in mantle cell lymphoma. *Exp Hematol*. luglio 2002;30(7):703–10.
 112. Hoster E, Pott C. Minimal residual disease in mantle cell lymphoma: insights into biology and impact on treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2 dicembre 2016;2016(1):437–45.
 113. Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VEH, Stow P, Coustan-Smith E, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 20 dicembre 2012;120(26):5173–80.
 114. Wu D, Emerson RO, Sherwood A, Loh ML, Angiolillo A, Howie B, et al. Detection of minimal residual disease in B lymphoblastic leukemia by high-throughput sequencing of IGH. *Clin Cancer Res*. 1 settembre 2014;20(17):4540–8.
 115. Ladetto M, Tavarozzi R, Pott C. Minimal Residual Disease in Mantle Cell Lymphoma: Methods and Clinical Significance. *Hematol Oncol Clin North Am*. ottobre 2020;34(5):887–901.
 116. Howard OM, Gribben JG, Neuberg DS, Grossbard M, Poor C, Janicek MJ, et al. Rituximab and CHOP induction therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma: molecular complete responses are not predictive of progression-free survival. *J Clin Oncol*. 1 marzo 2002;20(5):1288–94.
 117. Corradini P, Ladetto M, Zallio F, Astolfi M, Rizzo E, Sametti S, et al. Long-term follow-up of indolent lymphoma patients treated with high-dose sequential chemotherapy and autografting: evidence that durable molecular and clinical remission frequently can be attained only in follicular subtypes. *J Clin Oncol*. 15 aprile 2004;22(8):1460–8.
 118. Andersen NS, Pedersen LB, Laurell A, Elonen E, Kolstad A, Boesen AM, et al. Pre-emptive treatment with rituximab of molecular relapse after autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 10 settembre 2009;27(26):4365–70.
 119. Ferrero S, Daniela B, Lo Schirico M, Evangelista A, Cifaratti A, Drandi D, et al. Comprehensive Minimal Residual Disease (MRD) Analysis of the Fondazione Italiana Linfomi (FIL) MCL0208 Clinical Trial for Younger Patients with Mantle Cell

- Lymphoma: A Kinetic Model Ensures a More Refined Risk Stratification. *Blood*. 29 novembre 2018;132(Supplement 1):920–920.
120. Pott C, Schrader C, Gesk S, Harder L, Tiemann M, Raff T, et al. Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphoma. *Blood*. 15 marzo 2006;107(6):2271–8.
 121. Callanan MB, Macintyre E, Delfau-Larue MH, Thieblemont C, Oberic L, Gyan E, et al. Predictive Power of Early, Sequential MRD Monitoring in Peripheral Blood and Bone Marrow in Patients with Mantle Cell Lymphoma Following Autologous Stem Cell Transplantation with or without Rituximab Maintenance; Final Results from the LyMa-MRD Project, Conducted on Behalf of the Lysa Group. *Blood*. 5 novembre 2020;136(Supplement 1):12–3.
 122. Ferrero S, Dreyling M, European Mantle Cell Lymphoma Network. Minimal residual disease in mantle cell lymphoma: are we ready for a personalized treatment approach? *Haematologica*. luglio 2017;102(7):1133–6.
 123. Gressin R, Callanan M, Daguindau N, Tempescul A, Carras S, Moles MP, et al. Frontline Therapy with the Ribvd Regimen Elicits High Clinical and Molecular Response Rates and Long PFS in Elderly Patients Mantle Cell Lymphoma (MCL); Final Results of a Prospective Phase II Trial By the Lysa Group. *Blood*. 6 dicembre 2014;124(21):148–148.
 124. Lakhota R, Melani C, Dunleavy K, Pittaluga S, Saba N, Lindenberg L, et al. Circulating tumor DNA predicts therapeutic outcome in mantle cell lymphoma. *Blood Adv*. 26 aprile 2022;6(8):2667–80.
 125. Kolstad A, Laurell A, Jerkeman M, Grønbaek K, Elonen E, Rätty R, et al. Nordic MCL3 study: 90Y-ibritumomab-tiuxetan added to BEAM/C in non-CR patients before transplant in mantle cell lymphoma. *Blood*. 8 maggio 2014;123(19):2953–9.
 126. Fisher RI, Dahlberg S, Nathwani BN, Banks PM, Miller TP, Grogan TM. A clinical analysis of two indolent lymphoma entities: mantle cell lymphoma and marginal zone lymphoma (including the mucosa-associated lymphoid tissue and monocytoid B-cell subcategories): a Southwest Oncology Group study. *Blood*. 15 febbraio 1995;85(4):1075–82.
 127. Pott C, Hoster E, Beldjord K, Macintyre EA, Böttcher S, Asnafi V, et al. R-CHOP/R-DHAP Compared to R-CHOP Induction Followed by High Dose Therapy with Autologous Stem Cell Transplantation Induces Higher Rates of Molecular Remission In

- MCL: Results of the MCL Younger Intergroup Trial of the European MCL Network. *Blood*. 19 novembre 2010;116(21):965–965.
128. Lenz G, Dreyling M, Schiegnitz E, Forstpointner R, Wandt H, Freund M, et al. Myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission prolongs progression-free survival in follicular lymphoma: results of a prospective, randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 1 novembre 2004;104(9):2667–74.
 129. Kaplan LD, Maurer MJ, Stock W, Bartlett NL, Fulton N, Pettinger A, et al. Bortezomib Maintenance (BM) or Consolidation (BC) Following Aggressive Immunochemotherapy and Autologous Stem Cell Transplant (ASCT) for Untreated Mantle Cell Lymphoma (MCL): 8 Year Follow up of CALGB 50403 (Alliance). *Blood*. 29 novembre 2018;132(Supplement 1):146–146.
 130. Klener P, Fronkova E, Kalinova M, Belada D, Forsterova K, Pytlik R, et al. Potential loss of prognostic significance of minimal residual disease assessment after R-CHOP-based induction in elderly patients with mantle cell lymphoma in the era of rituximab maintenance. *Hematol Oncol*. dicembre 2018;36(5):773–8.
 131. Albertsson-Lindblad A, Kolstad A, Laurell A, Råty R, Grønabæk K, Sundberg J, et al. Lenalidomide-bendamustine-rituximab in patients older than 65 years with untreated mantle cell lymphoma. *Blood*. 6 ottobre 2016;128(14):1814–20.
 132. Le Gouill S, Beldi-Ferchiou A, Cacheux V, Salles G, Canioni D, Bodet-Milin C, et al. OBINUTUZUMAB PLUS DHAP FOLLOWED BY AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION (ASCT) PLUS OBINUTUZUMAB MAINTENANCE PROVIDES A HIGH MRD RESPONSE RATE IN UNTREATED MCL PATIENTS. RESULTS OF LYMA-101 TRIAL, A LYSA GROUP STUDY. *Hematol Oncol*. 12 giugno 2019;37(S2):44–5.
 133. Ferrero S, Monitillo L, Mantoan B, Barbero D, Genuardi E, Barbiero S, et al. Rituximab-based pre-emptive treatment of molecular relapse in follicular and mantle cell lymphoma. *Ann Hematol*. novembre 2013;92(11):1503–11.
 134. Ladetto M, Magni M, Pagliano G, De Marco F, Drandi D, Ricca I, et al. Rituximab induces effective clearance of minimal residual disease in molecular relapses of mantle cell lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*. dicembre 2006;12(12):1270–6.
 135. Jain P, Wang M. Mantle cell lymphoma: 2019 update on the diagnosis, pathogenesis, prognostication, and management. *Am J Hematol*. giugno 2019;94(6):710–25.

136. Ruan J, Martin P, Christos P, Cerchietti L, Tam W, Shah B, et al. Five-year follow-up of lenalidomide plus rituximab as initial treatment of mantle cell lymphoma. *Blood*. 8 novembre 2018;132(19):2016–25.
137. Pott C, Macintyre E, Delfau-Larue MH, Ribrag V, Unterhalt M, Kneba M, et al. MRD Eradication Should be the Therapeutic Goal in Mantle Cell Lymphoma and May Enable Tailored Treatment Approaches: Results of the Intergroup Trials of the European MCL Network. *Blood*. 6 dicembre 2014;124(21):147–147.
138. Zaccaria GM, Ferrero S, Rosati S, Ghislieri M, Genuardi E, Evangelista A, et al. Applying Data Warehousing to a Phase III Clinical Trial From the Fondazione Italiana Linfomi Ensures Superior Data Quality and Improved Assessment of Clinical Outcomes. *JCO Clin Cancer Inform*. ottobre 2019;3:1–15.
139. Hoster E, Metzner B, Forstpointner R, Pfreundschuh M, Trümper L, Hallek M, et al. Autologous Stem Cell Transplantation and Addition of Rituximab Independently Prolong Response Duration in Advanced Stage Mantle Cell Lymphoma. *Blood*. 20 novembre 2009;114(22):880–880.
140. Andersen NS, Donovan JW, Borus JS, Poor CM, Neuberg D, Aster JC, et al. Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma assessed by polymerase chain reaction detection of minimal residual disease. *Blood*. 15 novembre 1997;90(10):4212–21.
141. Corradini P, Ladetto M, Zallio F, Astolfi M, Rizzo E, Sametti S, et al. Long-Term Follow-Up of Indolent Lymphoma Patients Treated With High-Dose Sequential Chemotherapy and Autografting: Evidence That Durable Molecular and Clinical Remission Frequently Can Be Attained Only in Follicular Subtypes. *Journal of Clinical Oncology*. 15 aprile 2004;22(8):1460–8.
142. Robinson S, Dreger P, Caballero D, Corradini P, Geisler C, Ghielmini M, et al. The EBMT/EMCL consensus project on the role of autologous and allogeneic stem cell transplantation in mantle cell lymphoma. *Leukemia*. 18 febbraio 2015;29(2):464–73.
143. Tarella C, Passera R, Magni M, Benedetti F, Rossi A, Gueli A, et al. Risk Factors for the Development of Secondary Malignancy After High-Dose Chemotherapy and Autograft, With or Without Rituximab: A 20-Year Retrospective Follow-Up Study in Patients With Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 1 marzo 2011;29(7):814–24.
144. Goy A, Sinha R, Williams ME, Kalayoglu Besisik S, Drach J, Ramchandren R, et al. Single-Agent Lenalidomide in Patients With Mantle-Cell Lymphoma Who Relapsed or Progressed After or Were Refractory to Bortezomib: Phase II MCL-001 (EMERGE) Study. *Journal of Clinical Oncology*. 10 ottobre 2013;31(29):3688–95.

145. Trněný M, Lamy T, Walewski J, Belada D, Mayer J, Radford J, et al. Lenalidomide versus investigator's choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): a phase 2, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol.* marzo 2016;17(3):319–31.
146. Wang M, Fayad L, Wagner-Bartak N, Zhang L, Hagemester F, Neelapu SS, et al. Lenalidomide in combination with rituximab for patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: a phase 1/2 clinical trial. *Lancet Oncol.* luglio 2012;13(7):716–23.
147. Holstein SA, Jung SH, Richardson PG, Hofmeister CC, Hurd DD, Hassoun H, et al. Updated analysis of CALGB (Alliance) 100104 assessing lenalidomide versus placebo maintenance after single autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* settembre 2017;4(9):e431–42.
148. Attal M, Lauwers V, Cancaes, Marit G, Caillot D, Facon T, Hulin C, et al. Maintenance Treatment with Lenalidomide After Transplantation for MYELOMA: Final Analysis of the IFM 2005-02. *Blood.* 19 novembre 2010;116(21):310–310.

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo elaborato, desidero dedicare questo spazio alle persone che più mi sono state accanto non solo nella stesura di questa Tesi, ma soprattutto in questi sei anni e senza le quali questo percorso sarebbe stato decisamente più in salita.

Primi tra tutti i miei genitori, inutile dire che senza di voi tutto questo non sarebbe stato possibile. Grazie *mamma* per tutti i “comunque vada, sarà un successo”, io faccio finta di non sentirti quando lo dici, ma alla fine hai sempre ragione tu; grazie *papà* per avermi ascoltata ripetere le catene montuose alle Elementari prima e il decorso dei vasi all’Università poi, senza farmi perdere, con ogni tua battuta, il piacere di fare quello che faccio. È grazie ai vostri sacrifici, al vostro supporto e al vostro amore incondizionato se sono arrivata fino a qui.

Insieme a voi vorrei ringraziare tutta la mia famiglia, i miei nonni, i miei zii e Lorenzo, grazie per avermi supportata in tutti questi anni e per aver riposto in me la vostra fiducia.

Un ringraziamento speciale vorrei dedicarlo a *Milli e Palu*: siete state le mie compagne in tutto, nello studio e nella vita quotidiana, nei momenti di sconforto e in quelli più felici. Non vedo l’ora di condividere il futuro con voi e di mangiare una pasta al pesto insieme tra qualche anno, unite come oggi, ma senza un esame il giorno dopo. Grazie a tutti i miei compagni, *Jas, Bove, Lulo, Teo e Ste*, per aver reso ogni giornata più leggera; sarete dei Medici fantastici, ne sono sicura, e lavorare con voi sarà un onore.

Vorrei, poi, ringraziare le mie amiche di sempre. *Vicky*, da quel giorno all’asilo la mano non ce la siamo più lasciata, potranno separarci anche migliaia di chilometri, ma tu sarai sempre la mia più grande certezza. *Sara*, con te è come avere una sorella che vive qualche via più in là, le porte delle nostre case sono sempre state aperte l’una per l’altra e sono sicura lo saranno sempre; grazie per tutti i tuoi consigli preziosi, per ogni risata e per tutte le nostre avventure. Grazie a *Eli, Sara B., Anna, Ali* e a tutte le mie amiche, ogni momento con voi ha reso tutto più semplice e certamente più divertente: il vostro immancabile supporto rimarrà per me sempre una certezza.

Grazie *Zuffi*, sei stata una delle più grandi costanti in questi sei anni (e non solo). Grazie per avermi accolta ogni volta come una sorella, per ogni telefonata e per ogni abbraccio. Non so bene cosa voglia dire avere un fratello, ma credo che più o meno sia questo. Un grazie

speciale anche a *Chidde*, il tuo punto di vista è stato prezioso in questi mesi, e a tutti i ragazzi del *Tetre*, con voi il tempo passa decisamente più velocemente.

Ale, ti ho lasciato per ultimo in questi ringraziamenti perché sei entrato nella mia vita a metà di questo percorso, ma, con una semplicità quasi inspiegabile, ne sei diventato parte fondamentale. Grazie per essere stato il mio compagno di studi, la mia spalla e anche un po' la mia casa in questi anni. Hai saputo donarmi un modo diverso di guardare le cose, il bicchiere con te è sempre mezzo pieno. E grazie per non essere fuggito mentre studiavo Anatomia Patologica, non so bene come tu abbia fatto a non farlo. Grazie per ogni momento insieme, la vita con te accanto è decisamente più bella.