

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA – DIMED

Direttore: Prof. Paolo Simioni

UNITÀ OPERATIVA DI CLINICA DERMATOLOGICA

Direttore: Prof. Mauro Salvatore Alessandro Alaibac

TESI DI LAUREA

MODELLO SPERIMENTALE DI IMMUNOTERAPIA DELLA
MICOSI FUNGOIDE: STUDIO PILOTA

Relatore: Prof. Mauro Salvatore Alessandro Alaibac

Co-relatore: Dr. Alvise Sernicola

Laureando: Francesco Cama

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

“A mamma.”

INDICE

I. ABSTRACT	3
I.I INTRODUZIONE.....	3
I.II SCOPO DELLO STUDIO	3
I.III MATERIALI E METODI.....	3
I.IV RISULTATI	4
I.V CONCLUSIONI	4
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Linfomi cutanei primitivi	5
1.1.1 Classificazione	5
1.1.2 Epidemiologia	7
1.1.3 Eziopatogenesi	7
1.1.4 Manifestazioni Cliniche	7
1.1.5 Diagnosi	8
1.1.6 Staging	8
1.1.7 Terapia	9
1.1.8 Prognosi e qualità di vita.....	10
1.2 Micosi fungoide	11
1.2.1 Generalità	11
1.2.2 Epidemiologia	12
1.2.3 Eziologia	12
1.2.4 Patogenesi	13
1.2.5 Clinica	16
1.2.6 Anatomia patologica	23
1.2.7 Diagnosi	25
1.2.8 Stadiazione e prognosi.....	30
1.2.9 Terapia	36
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	43
3. MATERIALI E METODI	45

4. RISULTATI.....49
5. CONCLUSIONI.....53

I. ABSTRACT

I.I INTRODUZIONE

La micosi fungoide (MF) è la forma più rappresentata di linfoma primitivo cutaneo a cellule T. La sua forma classica si manifesta con un andamento clinico generalmente lento, progredendo attraverso tre fasi distinte: chiazza, placca e nodulo tumorale. I linfociti maligni della micosi fungoide originano da cellule T memoria effettrici che esprimono il cutaneous lymphocyte antigen (CLA). Il CLA è considerato un biomarcatore periferico di attivazione immunitaria cutanea in disturbi cutanei infiammatori e immunomediati, come la dermatite atopica, e in quelli neoplastici, come la micosi fungoide. In condizioni fisiologiche, i linfociti T subiscono un processo di ricircolazione che dalla pelle li porta al circolo linfatico ed infine attraverso il torrente ematico nuovamente alla pelle. Nella micosi fungoide, l'espressione elevata di CLA è responsabile per l'epidermotropismo delle cellule neoplastiche, che si accumulano nella cute e conferiscono un comportamento in genere indolente a questo linfoma. Lo sviluppo di strategie terapeutiche dirette a livello cutaneo, che sfruttino le caratteristiche immunologiche e cliniche peculiari della micosi fungoide, può produrre elevate efficacia e selettività, minimizzando il rischio di tossicità sistemica. Gli approcci di immunoterapia con anticorpi monoclonali possono garantire una specificità per il clone neoplastico e la possibilità di coniugarli a molecole citotossiche può aumentare la risposta al trattamento.

I.II SCOPO DELLO STUDIO

La finalità di questo studio in vitro è esaminare, su una linea di linfociti T di micosi fungoide, l'effetto dell'immunoterapia utilizzando coniugati anticorpo-farmaco (antibody-drug conjugates, ADC). In particolare, è stata posta l'attenzione sulla possibilità di usare l'antigene di superficie CLA, come target terapeutico per MF, in combinazione con monomethyl-auristatin-E (MMAE), un agente antineoplastico.

I.III MATERIALI E METODI

Questo studio in vitro ha impiegato cellule My-La CD4+ derivate da micosi fungoide che sono state incubate con i coniugati anticorpo anti-CLA e MMAE oppure anti-CLA.

La vitalità delle cellule è stata misurata tramite colorazione con ioduro di propidio dopo 24 ore dall'incubazione.

I.IV RISULTATI

Non si è evidenziata una differenza significativa tra il campione trattato e quello di controllo in ciascuno dei due gruppi di trattamento; pertanto la strategia esaminata non ha prodotto una risposta soddisfacente.

I.V CONCLUSIONI

I risultati del nostro studio sono significativi per orientare future ricerche in quanto ci consentono di analizzare le caratteristiche dei coniugati utilizzati: l'anticorpo diretto contro CLA non viene internalizzato dalle cellule dopo il legame con il recettore e per questo motivo l'MMAE non si concentra abbastanza all'interno della cellula per esercitare la sua attività citotossica.

1. INTRODUZIONE

1.1 Linfomi cutanei primitivi

I linfomi cutanei primitivi (PCL, Primitive Cutaneous Lymphomas) sono un gruppo eterogeneo di linfomi non-Hodgkin caratterizzati da andamento variabile e rappresentano la seconda forma più comune di linfomi extra-nodali, dopo quelli che coinvolgono il tratto gastrointestinale [1].

Questi linfomi si presentano esclusivamente a livello cutaneo al momento della diagnosi e entro sei mesi dalla manifestazione della patologia, senza coinvolgimento di altre strutture. Per la maggior parte del tempo, rimangono confinati alla cute e tendono ad avere un andamento indolente, offrendo quindi una prognosi nettamente migliore rispetto ai linfomi con caratteristiche istologiche simili che interessano altre sedi [1]. I PCL rappresentano un complesso insieme di patologie comprendenti più di cento entità, come indicato nella classificazione WHO-EORTC (2018), definite attraverso caratteristiche cliniche istopatologiche, morfologiche, immunofenotipiche e genetiche [2].

1.1.1 Classificazione

Data l'origine cellulare è possibile suddividere i PCL in due categorie di linfomi cutanei a: cellule T (cutaneous T cell lymphomas, CTCLs) e cellule B (cutaneous B cell lymphomas, CBCLs). L'incidenza dei primi è notevolmente maggiore rispetto ai secondi: il 75-80% di tutti i PCL sono dei CTCLs. Nel 2018 è stata pubblicata la quarta edizione della WHO-EORTC [2].

La Tabella 1 serve a classificare i linfomi primitivi cutanei in base alla Frequenza espressa in percentuale e alla relativa sopravvivenza a cinque anni.

Tabella 1 Classificazione WHO-EORTC del 2018.

WHO-EORTC classification	No.	Frequency, %*	Disease-specific 5-year survival, %
Cutaneous T-cell lymphoma			
Indolent clinical behavior			
Mycosis fungoides	800	44	88
Folliculotropic MF	86	4	80
Pagetoid reticulosis	14	< 1	100
Granulomatous slack skin	4	< 1	100
Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma	146	8	95
Lymphomatoid papulosis	236	12	100
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma	18	1	82
Primary cutaneous CD4 ⁺ small/medium pleomorphic T-cell lymphoma†	39	2	75
Aggressive clinical behavior			
Sézary syndrome	52	3	24
Primary cutaneous NK/T-cell lymphoma, nasal-type	7	< 1	NR
Primary cutaneous aggressive CD8 ⁺ T-cell lymphoma†	14	< 1	18
Primary cutaneous γ/δ T-cell lymphoma†	13	< 1	NR
Primary cutaneous peripheral T-cell lymphoma, unspecified‡	47	2	16
Cutaneous B-cell lymphoma			
Indolent clinical behavior			
Primary cutaneous marginal zone B-cell lymphoma	127	7	99
Primary cutaneous follicle center lymphoma	207	11	95
Intermediate clinical behavior			
Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type	85	4	55
Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, other	4	< 1	50
Primary cutaneous intravascular large B-cell lymphoma	6	< 1	65

Dall'analisi dei dati forniti emerge che la micosi fungoide (MF) rappresenta la variante più comune dei CTCLs, costituendo circa il 60% di questi e il 40-50% di tutti i PCL. Mentre la PR e la GSS sono estremamente rare, la FMF costituisce circa il 10% di tutti i casi di MF [4,5].

La sindrome di Sézary (SS) è una rara forma dell'età adulta di CTCL caratterizzata dalla presenza di cellule di Sézary e da linfadenopatie generalizzate (cellule T a nuclei cerebriformi circolanti) [2,3,6].

Questo gruppo di patologie include prevalentemente la Papulosi Linfomatoide (LyP), la quale comprende cinque diversi sottotipi [3]. È importante sottolineare che la presentazione e il decorso clinico sono criteri cruciali per distinguere la LyP dal C-ALCL, poiché presentano caratteristiche istologiche e fenotipiche sovrapponibili [7,8]. Per quanto concerne i CBCLs, questi possono essere suddivisi in tre forme principali: il linfoma primitivo cutaneo della zona marginale (PCMZL), il linfoma cutaneo primitivo centro follicolare (PCFCL) ed il linfoma cutaneo primitivo a grandi cellule B "leg type" (PCDLBCL, LT) [3]. Negli ultimi anni, si è ottenuta una migliore comprensione della patogenesi di questi linfomi, sviluppando nuove tecniche diagnostiche, prognostiche e terapeutiche [2,9].

1.1.2 Epidemiologia

I PCL sono la seconda forma più frequente di linfomi extra-nodali, con un'incidenza in occidente intorno a $1/10^5$ casi per anno [10]. La maggior parte dei CTCLs sono rappresentati dalla MF e dalla sindrome di Sézary [11,12]. L'incidenza di questi linfomi è in aumento; tuttavia, questa crescita è dovuta, in particolar modo, alla maggiore sensibilità degli strumenti diagnostici oltre che ad un effettivo aumento della casistica [13]. Infine, osservando l'incidenza dei CTCL in base all'età del paziente, si nota osserva maggiore prevalenza negli adulti, e solo raramente in pazienti giovani [5,14]. Considerando l'etnia è nettamente superiore la presenza delle neoplasie negli afroamericani rispetto alla popolazione caucasica e quella asiatica [15,16].

L'incidenza è lievemente maggiore negli uomini rispetto alle donne, nonostante tale scostamento si stia lentamente assottigliando [15].

1.1.3 Eziopatogenesi

L'eziologia dei linfomi cutanei primitivi è ancora indeterminata: si suppone che per il loro sviluppo sia presente una componente di tipo multifattoriale e multifasica [17]. L'ipotesi più considerata valuta un insieme di stimoli genetici, ambientali, infettivi ed immunologici come fattore di innesco di uno stato di infiammatorio cronico, condizione che predispone allo sviluppo della malattia [18]. Sono necessarie mutazioni nella regolazione di geni che iperattivano degli oncogeni, l'inattivazione di oncosoppressori e la disfunzione dei meccanismi di riparo del DNA.

1.1.4 Manifestazioni Cliniche

I PCL hanno una presentazione clinica estremamente variegata e dipendente dal sottotipo specifico. Per la MF, il prurito e le ulcerazioni delle lesioni tumorali sono i sintomi maggiormente lamentati dai pazienti [19]. La sindrome di Sézary si manifesta con: un forte prurito, ipercheratosi associate ad alopecia [2].

Nel gruppo delle malattie più rare a cellule T CD30+, la LyP manifesta principalmente papule ricorrenti e noduli ulcerati associati a guarigione spontanea. I C-ALCL si presentano come tumori solitari raramente multifocali.

1.1.5 Diagnosi

Per una corretta diagnosi è fondamentale valutare nel completo il paziente, partendo dalla raccolta dell'anamnesi associata ad esame obiettivo ed istopatologico delle lesioni, supportato immunofenotipici e dove possibile dalla citometria a flusso [19]. Nonostante l'accuratezza degli esami appena citati e il persistere di un sospetto clinico, è essenziale ricordare che la diagnosi è spesso complessa, richiedendo l'esecuzione di multiple biopsie [20].

La clinica, resta comunque, il più grande contributo in una possibile diagnosi di PCL [21,22]; di conseguenza il tipo e il numero delle lesioni cutanee siano di fondamentale importanza per una corretta diagnosi differenziale [19].

1.1.6 Staging

La corretta stadiazione risulta molto importante in tutti i pazienti con PCL per escludere patologia sistemica e per scegliere la terapia più corretta. Risulta, quindi, necessario aggiungere all'esame obiettivo completo gli esami emocromocitometrici e sierologici valutando anche l'enzima lattato deidrogenasi (LDH) [23].

Per completare il processo di staging può risultare necessario eseguire degli esami di imaging, tra cui: l'RX torace, la TC con mezzo di contrasto e la FDG-PET/TC. Il mezzo di contrasto della PET risulta importante, non tanto per la valutazione della malattia a livello cutaneo quanto per l'individuazione di lesioni viscerali [24]. La biopsia del midollo osseo va effettuata in linfomi con comportamento clinico intermedio/aggressivo, soprattutto nei linfomi B, mentre risulta non necessaria nelle forme indolenti [23].

La citometria a flusso è raccomandata per pazienti con sospetto di sindrome di Sézary. Per la MF e la sindrome di Sézary è stata creata una classificazione apposita, la TNMB-classification (Tabella 2.)[25].

Tabella 2. Classificazione TNMB per quanto riguarda la micosi fungoide e la sindrome di Sézary.

TNMB Classification of mycosis fungoides and sezary syndrome

T (skin)

T1	Limited patch/plaque (involving<10% of total skin surface)
T2	Generalized patch/plaque (involving>10% of total skin surface)
T3	Tumor(s)
T4	Erythroderma

N (lymph node)

N0	No enlarged lymph nodes
N1	Enlarged lymph nodes, histologically uninvolved
N2	Enlarged lymph nodes, histologically involved (nodal architecture unaffected)
N3	Enlarged lymph nodes, histologically involved (nodal architecture effaced)

M (viscera)

M0	No visceral involvement
M1	Visceral involvement

B (blood)

B0	No circulating atypical (Sezary) cells or <5% of lymphocytes
B1	Low blood tumor burden (>5% of lymphocytes are Sezary cells, but not B2)
B2	High blood tumor burden (1000/mL Sezary cells+positive clone)

1.1.7 Terapia

La maggior parte dei linfomi cutanei ha un decorso clinico indolente restando localizzata a livello cutaneo.

Le terapie cutanee sono più efficaci in queste neoplasie, mentre, la terapia sistemica essendo citotossica dimostra maggiore efficacia nei linfomi non cutanei che interessano i visceri [23]. L’obiettivo della terapia è il controllo delle lesioni cutanee e la minimizzazione della morbilità. I trattamenti più utilizzati a livello cutaneo sono: gli steroidi topici; le mostarde azotate topiche; i retinoidi topici (derivati della vitamina

A); la fototerapia sottoforma di UVB o PUVA fotochemioterapia e la total-skin electron beam therapy (TSEBT) [23].

Tra i trattamenti sistemici, invece, si possono annoverare: il metotrexate; i retinoidi (bexarotene); l'interferone- α usato di solito in combinazione con PUVA [26,27]; i farmaci citostatici [23]. L'ultimo step della terapia prevede l'utilizzo di chemioterapia sistemica ad alte dosi o il trapianto allogenico.

Alcuni farmaci di nuova generazione stanno portando ad una buona risposta clinica: gli inibitori dell'istone deacetilasi come la Romidepsina e il Vorinostat; il Pralatrexate; il Rituximab (anti-CD20) attivo sui CBCL; Brentuximab-Vedotin, anticorpo monoclonale anti CD-30 associato ad MMAE; Mogamulizumab, anticorpo monoclonale anti-CD194.

1.1.8 Prognosi e qualità di vita

La prognosi dipende dal tipo di PCL: di tutti i pazienti affetti da MF solo il 15-20% muoia a causa di tale patologia [28], mentre la sopravvivenza a 5 anni nella sindrome di Sézary si aggira intorno al 30-35%, a causa delle complicanze infettive legate alle importanti disfunzioni immunitarie associate a tale patologia.

Non sono presenti modalità capaci di valutare la qualità della vita dei pazienti affetti da PCL; tuttavia, i pazienti affetti da sindrome di Sézary e da MF soffrono di maggiori problematiche rispetto ai pazienti affetti da altre condizioni dermatologiche [32].

1.2 Micosi fungoide

1.2.1 Generalità

La micosi fungoide è la forma più comune di linfoma cutaneo a cellule T, rappresentando da sola circa il 40% di tutti i PLC [3,9]. Questo tipo di linfoma ha una certa rilevanza storica, poiché è stato il primo linfoma maligno descritto dal dermatologo francese Jean-Louis Alibert nel 1806 [33]. Il termine "micosi fungoide" è stato coniato per la sua somiglianza con le lesioni causate da infezioni fungine [34]. I pazienti con la MF classica, come descritta da Jean Alibert (1768-1837) ed Ernest Bazin (1807-1878), rappresenta lo stadio iniziale di patologia, caratterizzata da chiazze o placche squamose localizzate in aree non fotoesposte [3]. In passato, la stadiazione della malattia era basata sulla presentazione clinica: si distinguevano una fase premicotica con chiazze; una fase micotica con placche e una fase tumorale con noduli. Durante la fase tumorale solitamente era presente un lungo periodo caratterizzato dalla presenza di chiazze o placche [35]. Successivamente, sono state identificate altre varianti di micosi fungoide, associate ad infiltrazione di cellule T atipiche, come: la micosi fungoide follicolotropica (FMF), la reticolosi pagetoide (PR) e la cute lassa granulomatosa (GSS). Solo nel 1975 è stato scoperto che le cellule responsabili dell'insorgenza e dello sviluppo della malattia sono i linfociti T.

Nella definizione più recente, la micosi fungoide è classificata come un linfoma cutaneo a cellule T (CTCL), formato da piccoli e medi linfociti T con nuclei cerebriformi o ipercromici, con un fenotipo T-helper effettrici memoria (le varianti citotossiche non sono rare). La classificazione WHO-EORTC del 2018 stabilisce che il termine "micosi fungoide" dovrebbe essere riservato solo alle forme che evolvono nei tre stadi precedentemente menzionati o a varianti con un decorso clinico simile [9].

1.2.2 Epidemiologia

L'incidenza della MF è di 6-7 casi su 10^6 persone, con variazioni significative tra le diverse regioni. Questo rappresenta un aumento rispetto ai decenni precedenti, quando l'incidenza stimata era di circa 4 casi su 10^6 , indicando, così, una tendenza crescente [16]. In termini di differenze etniche, i caucasici sono i più colpiti, seguiti dagli afroamericani, dagli ispanici e infine dagli asiatici. Per quanto riguarda l'età, la malattia ha un'incidenza più elevata nella fascia di popolazione adulto/anziana, con un'età media alla diagnosi di circa 55-60 anni. Nonostante ciò, è importante notare che anche bambini e adolescenti possono essere colpiti, anche se raramente. Considerando il genere, si osserva una frequenza maggiore nei maschi rispetto alle femmine, con un rapporto di circa 2:1 [16,34,36,37].

1.2.3 Eziologia

L'eziologia della micosi fungoide rimane ancora sconosciuta, anche se è importante sottolineare il possibile ruolo delle patologie dermatologiche croniche: dall'esposizione prolungata a diversi allergeni alla predisposizione genetica nell'insorgenza della malattia.

Sono state avanzate due ipotesi riguardo le cause della micosi fungoide. La prima ipotesi suggerisce la presenza di un agente virale come causa principale: questo provocherebbe una disregolazione delle cellule T che potrebbe indurre la trasformazione maligna [8]. Gli studi finora condotti non hanno, ancora, stabilito collegamenti definitivi con specifiche infezioni virali. La seconda ipotesi propone, invece, che alla base dello sviluppo ci sia una stimolazione antigenica persistente nel tempo come fattore scatenante. Questa porterebbe, inizialmente, all'insorgenza di un'inflammatione cronica e successivamente allo sviluppo di linfociti T maligni. Per quanto riguarda l'eziopatogenesi, sono stati condotti alcuni studi epidemiologici per valutare se l'esposizione occupazionale a sostanze specifiche o allergeni potesse essere correlata allo sviluppo della malattia, ma questi non hanno dimostrato associazioni positive. Inoltre, le aree maggiormente colpite dalla malattia, cioè quelle non esposte

al sole, sono soggette solo a una minima esposizione alle sostanze ambientali, il che contrasta con l'ipotesi secondo cui le estremità dovrebbero essere più colpite [39]. Un'incidenza maggiore di micosi fungoide è stata osservata nei pazienti in seguito a trapianto d'organo, suggerendo che l'immunosoppressione potrebbe contribuire allo sviluppo della malattia.

1.2.4 Patogenesi

Epidermotropismo

Nella micosi fungoide, l'epidermotropismo dei linfociti T è mediato dall'espressione di specifici recettori che favoriscono la loro localizzazione selettiva a livello cutaneo. Uno dei recettori più importanti è l'antigene linfocitario cutaneo (CLA), il quale, tramite il legame con la E-selectina, facilita il reclutamento dei linfociti T dalle venule post-capillari a livello dermico [40]. Le chemochine, è stato osservato, svolgono un ruolo chiave nel reclutamento e nell'homing cutaneo dei linfociti T maligni attraverso il legame con recettori specifici espressi da queste cellule. Tra i recettori più rilevanti in questo contesto vi sono: il CCR4 (che lega alle chemochine CCL17 e CCL22); il CCR10 (che lega alla chemochina CCL27) e il CXCR3 (che lega alle chemochine CXCL9, CXCL10 e CXCL11) [41]. L'importanza di tali recettori è evidente perché nelle fasi avanzate della malattia, le cellule di MF ne esprimono un numero ridotto, causando la perdita dell'epidermotropismo e la diffusione della malattia a livello sistemico [41]. Il recettore CCR7, è stato osservato, predisponga durante la fase tumorale della micosi fungoide alla perdita dell'epidermotropismo e alla progressione sistemica della malattia. Questo recettore si ritrova sovraespresso nelle cellule maligne circolanti nella sindrome di Sézary e sembra favorire la metastatizzazione favorendo lo spostamento delle cellule T neoplastiche dalla cute [41,42].

Citochine

Studiando le variazioni delle citochine espresse nei diversi stadi della micosi fungoide, è stato possibile individuare nelle fasi precoci della malattia la prevalenza di un profilo citochinico Th1, caratterizzato da alti livelli di espressione di citochine come: IL-2, IL-12 e INF- γ . Nelle fasi avanzate si osserva, invece, un'inclinazione verso un profilo citochinico Th2 [43].

Macroscopicamente e durante l'esame obiettivo, la predominanza della risposta Th1, considerata maggiormente pro-infiammatoria, potrebbe essere correlata all'aspetto eczematoso caratteristico delle fasi iniziali della malattia. Successivamente, la risposta Th2 potrebbe essere associata alla proliferazione delle cellule tumorali e al declino della risposta immunitaria.

Alcune citochine specifiche, come l'IL-7 e l'IL-15, prodotte sia dai cheratinociti che dalle cellule maligne stesse, sono state identificate come molecole chiave nel determinare l'avanzamento della malattia e la proliferazione delle cellule T della memoria [45]. L'IL-2 e il suo recettore IL-2R, fosforilando diverse proteine intracellulari come "Janus kinase 3" (Jak-3), "Signal transducer and activator of transcription 5" (Stat-5) e Stat-3, stimolano l'iperattivazione cellulare necessaria per le cellule tumorali. La deviazione della risposta citochinica verso un profilo Th2, con attenuazione della risposta immunitaria, determina un aumento la suscettibilità alle infezioni cutanee che vengono osservate nelle fasi avanzate della MF.

Ambiente tumorale

Negli stadi iniziali della MF, l'ambiente tumorale è principalmente composto da cellule immunitarie Th1 non maligne, macrofagi e cellule dendritiche (DC). La presenza di cellule T CD8⁺ e Treg in questo contesto ha un significato prognostico positivo [46,47].

Si suppone che la presenza di cellule dendritiche immature sia necessaria per innescare il meccanismo di stimolazione antigenica cronica che porta allo sviluppo del linfoma [48].

Queste cellule svolgono una doppia e contrastante funzione. Nelle fasi iniziali della malattia, si ipotizza che queste cellule siano stimulate dagli antigeni tumorali specifici e che, lo stato infiammatorio da loro generato, favorisca la proliferazione incontrollata

delle cellule T maligne, determinando così lo sviluppo del linfoma. Nella fase avanzata della patologia, le cellule dendritiche, presentando antigeni tumorali specifici, sono in grado di promuovere una risposta immunitaria antitumorale da parte delle cellule T citotossiche. Inoltre, la presenza di cellule dendritiche epidermiche nei reperti istologici viene associata a una prognosi migliore.

Marker molecolari

Ad oggi, non è stato individuato un marcatore tumorale specifico e indispensabile per lo sviluppo della micosi fungoide (MF) [53]. Per quanto riguarda la patogenesi e la progressione della malattia, sono, però, considerate importanti alcune alterazioni genomiche, tra cui: l'amplificazione di MYC, la perdita di geni oncosoppressori come TP53 e degli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti 2A e 2B (CDKN2A e CDKN2B). Tali modifiche genomiche determinano la perdita di controllo sul ciclo cellulare e sull'inibizione dell'apoptosi: fondamentali per la formazione del linfoma [54]. La maggior parte degli studi condotti finora per identificare marcatori tumorali sono basati sulle biopsie di pazienti affetti da MF in fase avanzata. Di conseguenza, non è chiaro se le alterazioni cromosomiche individuate siano necessarie per lo sviluppo e la progressione del tumore oppure se siano solo un epifenomeno correlato all'instabilità genetica delle fasi avanzate della malattia [55].

Altra alterazione osservata è una maggiore espressione del gene Notch, che sembrerebbe avere un impatto significativo sulla progressione della malattia. La via di segnalazione mediata da Notch porta ad un aumento della trascrizione di geni anti-apoptotici come Bcl-2 e c-FLIP.

Sopravvivenza del sistema immunitario

Per inibire la crescita e la proliferazione delle cellule neoplastiche è fondamentale l'interazione del recettore Fas e il suo ligando Fas-L in quanto favoriscono l'apoptosi cellulare. Alcuni studi hanno dimostrato che durante le fasi iniziali le cellule tumorali esprimono questo recettore, mentre nelle fasi avanzate tale espressione è notevolmente ridotta o assente: ciò determina l'incapacità del sistema immunitario di eliminare efficacemente le cellule neoplastiche [49]. La soppressione del recettore Fas da parte delle cellule tumorali, soprattutto, negli stadi avanzati potrebbe essere associata ad un

meccanismo di escaping in tutti i CTCLs [50,51]. Secondo meccanismo che permette alle cellule tumorali di sfuggire alla risposta immunitaria è l'esaurimento funzionale delle cellule T. Questo può essere mediato dal rilascio cronico di molecole ad azione immunosoppressiva o da un'alterata modulazione delle cellule dendritiche da parte delle cellule maligne. A tale livello, si osserva nuovamente il profilo citochinico Th2, caratterizzato da citochine immunosoppressive come l'IL-10 e il TGF- β , che sopprimono l'immunità antitumorale e ostacolano la corretta maturazione delle cellule dendritiche. Si ipotizza che l'interazione tra le cellule T e le CD immature possa, anziché stimolare una risposta antitumorale, indurre una tolleranza nei confronti degli antigeni tumorali [52].

1.2.5 Clinica

La micosi fungoide può presentarsi sotto diverse varianti: la forma classica di “Alibert-Bazin” e nelle varianti della Micosi fungoide follicolotropica (FMF), la Reticolosi pagetoide (PR), la Cute lassa granulomatosa (GSS) e in altre varianti più rare.

Forma classica

La forma classica di micosi fungoide, conosciuta anche come Alibert-Bazin, si suddivide in tre stadi distinti: chiazza, placca e, infine, nodulo tumorale. Questo tipo di lesioni possono essere presenti in maniera sequenziale ma, in alcuni casi, anche contestualmente tra loro [3]. Nella fase iniziale della chiazza possono essere presenti singole e/o multiple macule squamose-eritematose, non palpabili e non infiltrate, di dimensioni variabili con contorni ben definiti. Il colore varia dall'arancione al rosso-violaceo. Le lesioni colpiscono principalmente le zone non foto esposte interessando inizialmente le aree intertriginose come la piega inframammaria nelle donne, la fessura interglutea, le ascelle e gli spazi interdigitali delle mani o dei piedi. L'eruzione può essere asintomatica o causare intenso prurito. Presentano lesioni patologiche transitorie che scompaiono spontaneamente senza lasciare cicatrici. La diagnosi in questa fase precoce è spesso complessa. I pazienti possono presentare una dermatite cronica che può persistere anche per 10-20 anni e che non risponde alle terapie topiche

convenzionali. In questi casi, è necessario eseguire multiple biopsie cutanee per giungere alla diagnosi. Questa fase può durare mesi o anni prima di progredire allo stadio successivo di placca. A volte, le placche possono comparire improvvisamente su aree cutanee precedentemente apparentemente sane. Nonostante le chiazze siano comunemente considerate lesioni precoci spesso sono presenti contemporaneamente a placche o noduli nei pazienti in uno stadio più avanzato della patologia. La placca si presenta come lesione infiltrante, squamosa, di colore rosso-violaceo e, in alcuni casi, potrebbe presentarsi come indurita e/o ulcerata. Queste lesioni possono regredire spontaneamente o fondersi per formare una placca più grande con bordi anulari, arcuati o serpiginosi. La porzione centrale delle lesioni può risolversi mentre l'attività di malattia persiste nelle zone periferiche. Nei pazienti di colore, le lesioni sono meno eritematose e hanno un aspetto grigio-argenteo, sembrando ipopigmentate. Questa forma di MF deve entrare in diagnosi differenziale con la vitiligine. I pazienti affetti da questa variante particolare rispondono alla terapia con una graduale ripigmentazione della pelle, mentre la comparsa di nuove aree ipopigmentate indica una ricaduta della malattia. Le lesioni tumorali indicano uno stadio avanzato della malattia. Come le altre lesioni descritte, queste possono essere solitarie, localizzate o generalizzate e possono comparire in qualsiasi parte del corpo, anche se prediligono la faccia e le pieghe cutanee come le ascelle, l'inguine, la fossa antecubitale e la piega inframammaria nelle donne [35]. Il coinvolgimento delle mucose è raro nelle fasi iniziali ma diventa più evidente con il progredire della malattia. In questa fase, le cellule tumorali assumono un comportamento più aggressivo, con un accumulo progressivo di cellule tumorali che porta alla formazione di noduli cutanei in espansione. I noduli appaiono lisci, di colore rosso-brunastro o rosso-violaceo con tendenza ad ulcerarsi e infettarsi successivamente. Il tasso di crescita delle lesioni è variabile: queste possono crescere rapidamente, anche in poche settimane, o non evolvere per mesi. L'eritrodermia, ovvero il coinvolgimento di almeno l'80% della superficie corporea, può comparire improvvisamente o svilupparsi durante il corso della MF. Se non è stata fatta una diagnosi precedente di MF classica, si parla di MF eritrodermica. La pelle, in caso di eritrodermia, appare di un color rosso brillante presentando isole di cute ben differenziate che non sono coinvolte dalla malattia. Questa condizione deve entrare in diagnosi differenziale con la sindrome di Sézary.

Sebbene in passato MF e sindrome di Sézary fossero entrambe considerate nel gruppo generico delle CTCL, ora sono considerate entità separate dalla classificazione WHO-EORTC [2]. Questo è dovuto alla presenza di differenze dal punto di vista molecolare prognostico e dell'approccio terapeutico. Questa differenziazione è evidente nel comportamento delle cellule: nella sindrome di Sézary le cellule tumorali sono in grado di circolare liberamente nel sangue, mentre i linfociti T della memoria della MF sono di tipo effetore e sono dotati di recettori specifici per cui sono individuabili principalmente a livello cutaneo [41,56]. Nelle fasi avanzate della malattia, non è raro che si verifichi l'evoluzione in linfoma anaplastico a cellule T [57]. In caso di metastasi le sedi più colpite sono: i linfonodi, seguiti dai polmoni, dal fegato, dalla milza e raramente colpiscono altri distretti corporei [58]. Nonostante la conferma istologica del coinvolgimento metastatico viscerale, è raro che si verifichino deficit funzionali.



Figura 1. Diversi stadi della micosi fungoide. Tratto da DermNet New Zealand

I pazienti affetti dalla forma classica possono manifestare: febbre, brividi, calo ponderale e malessere generale. Queste lesioni possono causare deficit nella deambulazione e nei movimenti delle mani.

Varianti cliniche

La WHO-EORTC 2018 riconosce solo tre varianti distinte di MF con comportamento, prognosi e caratteristiche clinico-patologiche diverse rispetto alla forma classica [3]: la Micosi fungoide follicolotropica (FMF), la Reticolosi pagetoide (PR) e la Cute lassa granulomatosa (GSS). Le altre varianti atipiche, invece, hanno un decorso simile a quello della MF tipica. A causa dell'elevata variabilità clinica la MF viene spesso definita la "grande imitatrice" [60].

Micosi fungoide follicolotropica

La FMF è il sottotipo più comune di MF, coinvolgendo circa il 12% di tutti i pazienti affetti da MF [4,61,65]. Clinicamente ritroviamo papule follicolari, placche indurite e chiazze localizzate nei follicoli. Possono essere presenti anche con lesioni acneiformi (come comedoni e cisti) o simili alla cheratosi pilare [66]. La regione della testa e del collo è quella prevalentemente colpita [3,66]. Questa variante si caratterizza per la presenza di infiltrati di cellule T follicolotropiche di piccole-medie dimensioni diffusi nel derma perifollicolare e per la distruzione dell'epitelio dei follicoli piliferi con la possibilità di sviluppare una reazione granulomatosa [67]. Quando è presente degenerazione mucinosa dei follicoli piliferi del cuoio capelluto, si parla di mucinosi follicolare [57,62]. La trasformazione in grandi cellule, definita dalla presenza di più del 25% di blasti o di blasti organizzati in cluster, è stata riportata in oltre il 20% dei casi di FMF. Dal punto di vista epidemiologico, questa variante interessa maggiormente gli adulti e raramente si osserva nei bambini e negli adolescenti [16,62]. Gli uomini sono più colpiti rispetto alle donne. La perdita di peli e dei capelli, soprattutto a livello sopraccigliare e il prurito intenso sono i sintomi più comuni di questa variante [66]. Quest'ultimo viene utilizzato per valutare il livello di attività della malattia. In passato, questa variante veniva considerata un sottotipo con decorso aggressivo e una cattiva prognosi rispetto allo stadio tumorale della MF classica [68].

Nei bambini, la FMF si presenta più frequentemente con placche ipopigmentate e alopecia, che devono essere differenziate dall'alopecia mucinosa sia dal punto di vista clinico che istopatologico. Il coinvolgimento preferenziale di testa e collo, l'assenza di chiazze e placche a livello del tronco e delle natiche e l'assenza di cellule T atipiche epidermotropiche possono portare a non considerare inizialmente la diagnosi di MF o altre CTCL, interpretando erroneamente la patologia confondendola con una condizione dermatologica benigna quali dermatite seborroica, dermatite atopica o rosacea.



Figura 2. Manifestazioni cliniche di micosi fungoide follicolotropica con chiazze eritematose e placche che coinvolgono l'area della testa/collo (A) e dell'area del tronco (B); istopatologia con infiltrato linfocitario perivascolare e perifollicolare con invasione dei follicoli piliferi da parte di cellule T atipiche [ematossilina-eosina 20x] (C); immunohistochimica: linfociti T CD3-positivi (D).

Reticolosi pagetoide (PR)

Questa variante si presenta tipicamente come una chiazza o una placca psoriasiforme o ipercheratosica solitaria, che progredisce lentamente e di solito localizzata alle estremità [3]. Contrariamente alla MF classica, non è stata osservata alcuna disseminazione sistemica. Questo contribuisce a rendere la prognosi eccellente [69]. Il termine "reticolosi pagetoide" dovrebbe essere utilizzato solo per la forma localizzata di Worniger-Kolopp e non per la forma disseminata di Ketrón-Goodman [70]. Questa variante mostra maggiore trofismo cutaneo e variabilità nucleare rispetto alla MF classica manifestandosi principalmente come lesione ipercheratosica.



Figura 3. Reticulosi pagetoide che si presenta come una placca ipercheratosica squamosa sulla fronte del paziente.

Cute lassa granulomatosa (GSS)

Si tratta di un raro sottotipo di MF caratterizzato da ingombranti pieghe cutanee in aree localizzate della pelle, con una predilezione per le ascelle e l'inguine [71,72]. Alla microscopia, si osserva infiltrato granulomatoso dermico di linfociti T. Sono spesso presenti piccole cellule atipiche con nuclei cerebriformi, macrofagi e cellule giganti multinucleate. La lassità della pelle è dovuta alla perdita di fibre di collagene da parte delle cellule giganti multinucleate. Le cellule neoplastiche sono CD3+, CD4+, CD8- e mostrano un riarrangiamento dei geni del TCR. Viene spesso associato ad altri linfomi maligni [73]. In questo sottogruppo di MF la migrazione extracutanea è estremamente rara permettendo nella maggior parte dei pazienti un decorso clinico indolente. Il trattamento di questa variante non porta a risultati soddisfacenti con terapie che non hanno portato a una risposta completa. A causa del rischio di sviluppo di una seconda neoplasia di stampo linfoide è necessario seguire il paziente con un follow-up a lungo termine.



Figura 4. Nell'immagine una placca eritematosa ben delimitata, costituita da pelle pendula, rugosa e rilassata, che occupa l'ascella è tipica della cute lassa granulomatosa.

1.2.6 Anatomia patologica

Le lesioni rilevate vengono sottoposte a biopsia e colorazione con ematossilina-eosina per una corretta interpretazione [81]. Nei diversi stadi le lesioni sono caratterizzate dalla presenza di un infiltrato nella porzione superiore del derma formato principalmente da linfociti T tumorali di piccole-medie dimensioni che presentano nuclei cerebriformi. Le neoplastiche mostrano uno spiccato trofismo cutaneo formando dei caratteristici aggregati intraepidermici noti come "microascessi di Pautrier" [35,82]. Anche se questi microascessi sono considerati distintivi della patologia, questi possono non essere presenti sia negli stadi precoci, specialmente nelle biopsie effettuate senza la sospensione anticipata del trattamento, sia nelle fasi avanzate della malattia [83]. Nonostante la presenza di criteri istopatologici per la diagnosi di MF, questa può essere posta solo in seguito ad associazione di questi criteri alla clinica. Oltre alla mancanza di lesioni patognomiche sono stati osservati numerosi pattern di MF precoce simili a quelli riscontrati nelle dermatosi infiammatorie.

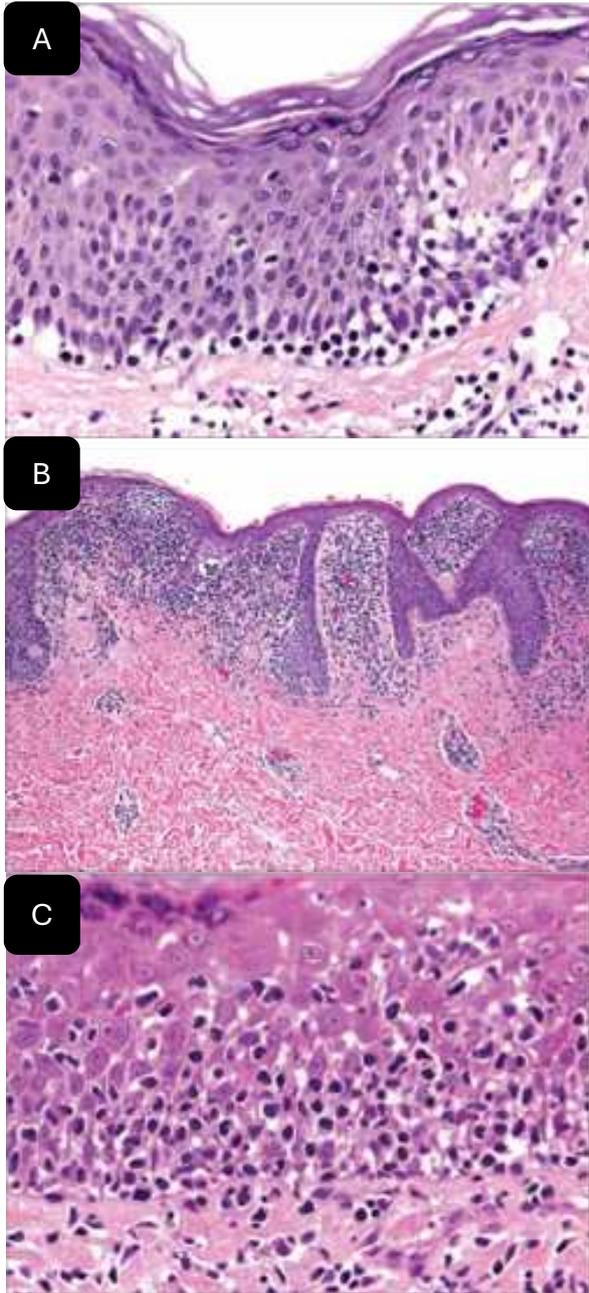


Figura 5. Istologia di MF. (A) Infiltrato linfonodale a banda con linfociti intraepiteliali e microascessi di Pautrier (B) epidermotropismo basale (C) linfociti intraepiteliali in un contesto di scarsa spongiosi.

Nello stadio tumorale si può osservare infiltrato nodulare diffuso che coinvolge l'intero derma e spesso anche il grasso sottocutaneo, mentre la componente epidermica risulta meno evidente. In questa fase, le lesioni diventano del tutto indistinguibili da altri tipi di linfomi a cellule NK e cellule T, sia primitivi che secondari. Negli stadi avanzati della MF, i linfociti di grandi dimensioni definiti come cellule pleomorfe o cellule anaplastiche diventano prominenti all'interno dell'infiltrato neoplastico. Questa trasformazione è definita da una percentuale superiore al 25% di linfociti di grandi dimensioni [57,84].

Immunofenotipo

Le cellule tumorali maligne presentano un immunofenotipo T-CD4+ maturo. La perdita, anche se parziale degli antigeni tipici delle cellule T come CD2, CD3, CD5, CD7 è caratteristica della MF soprattutto già negli stadi iniziali ed è stata ipotizzata come possibile criterio diagnostico [85]. Nonostante ciò la bassa frequenza di questa condizione e la non patognomonicità rendono tale reperto poco utile ai fini diagnostici. I marker di citotossicità come TIA-1, granzima B e perforina sono negativi nei casi comuni di MF, ma in una minoranza dei casi può essere osservato un fenotipo citotossico CD8+ soprattutto nei pazienti pediatrici. Non sono state riscontrate differenze cliniche e prognostiche tra i due fenotipi helper e citotossico. L'analisi genetica del TCR richiede tecniche di biologia molecolare come la Polymerase Chain Reaction (PCR) o il Southern-Blot. Lo studio della clonalità si è dimostrato di scarsa utilità in quanto i riarrangiamenti clonali sono presenti solamente in metà delle biopsie dei pazienti in stadi precoci [22]. Il sequenziamento mediante PCR aumenta sia la sensibilità che la specificità e consente una migliore caratterizzazione dei cloni neoplastici.

Nelle lesioni avanzate di MF si possono osservare un gran numero di linfociti B reattivi CD20+ che possono formare dei veri e propri centri germinativi. La presenza di questo tipo cellulare può mascherare la vera natura del linfoma e non deve essere interpretata in maniera errata come neoplasia a cellule B. Sono stati descritti in letteratura linfomi composti, caratterizzati dalla presenza di linfomi a cellule B e cellule T [35].

1.2.7 Diagnosi

Diagnosticare in maniera efficace la micosi fungoide non è semplice soprattutto a causa delle numerose varianti cliniche ed istologiche e per la somiglianza con molte patologie dermatologiche, sia benigne che maligne. Diagnosticare con accuratezza è necessaria una combinazione di reperti clinici e istologici, poiché, se valutati singolarmente, sono troppo eterogenei ed aspecifici per poter confermare la diagnosi [3,34,35]. Il fattore temporale rappresenta un'altra sfida importante: il periodo che

intercorre dalle fasi iniziali della patologia fino alla diagnosi definitiva può essere di diversi anni [82]. Per diagnosticare la MF è fondamentale effettuare un'approfondita anamnesi e un esame obiettivo, seguiti, poi, dall'esecuzione di una o più biopsie cutanee con esami istologici ed immunohistologici per caratterizzare il quadro. Può essere utile condurre uno studio immunofenotipico e valutare il riarrangiamento del TCR oltre alla possibilità di effettuare altri esami di supporto.

Esame obiettivo

L'esame obiettivo è di fondamentale importanza per sospettare la presenza di MF. Le lesioni cutanee riscontrate devono essere accuratamente valutate e misurate per determinare la percentuale di superficie corporea coinvolta [83]. Durante questa fase, oltre all'analisi delle lesioni cutanee è essenziale esaminare e valutare anche i linfonodi periferici. Questo per cercare eventuali alterazioni nella forma, nelle dimensioni e nelle caratteristiche come la fissità o la dolorabilità. Tutti i linfonodi anomali o di dimensioni maggiori di 1,5 cm devono essere successivamente valutati mediante imaging o tramite biopsia per aspirazione con ago sottile (FNAB) [83].

Biopsia cutanea ed esame istologico

Di routine in sospetto di MF vengono eseguite più biopsie cutanee nel tempo in quanto le caratteristiche istologiche sono, spesso, sovrapponibili a quelle di altre patologie cutanee di tipo infiammatorio. Per aumentare la sensibilità è fondamentale individuare correttamente la sede e la tipologia di lesione da sottoporre a biopsia. La scelta deve orientarsi verso le lesioni di maggiori dimensioni o quelle maggiormente indurite [60]. Nel caso in cui siano presenti più stadi di lesione contemporaneamente è necessario effettuare una biopsia per ciascuna tipologia. È importante valutare se sono presenti le due caratteristiche più comuni di MF precoce: la presenza di marcato tropismo cutaneo e la presenza di microascessi di Pautrier[81]. I riscontri istologici divisi per lo stadio di patologia sono già stati affrontati nel capitolo precedente "anatomia patologica".

Immunofenotipo

Contestualmente alla biopsia risulta importante valutare l'immunofenotipo e la presenza di modifiche o riarrangiamenti dei geni del TCR al fine di una corretta

diagnosi. Il fenotipo più comune riscontrato è il T helper CD4+ maturo, ma possono essere riscontrati anche altri fenotipi come: il CD8+, CD30+, CD56+, CD4/CD8 doppio positivo o doppio negativo[87].

Esami di approfondimento

Tali esami non sono essenziali per la diagnosi, ma possono risultare importanti per una corretta stadiazione e per la prognosi del paziente. Per valutare correttamente la prognosi del paziente è necessario associare agli esami appena discussi un esame emocromocitometrico completo con associato pannello metabolico e una valutazione degli indici di funzionalità d'organo [3,60]. In caso di coinvolgimento ematologico, sarà importante effettuare la citometria a flusso per valutare la presenza e il numero di cellule di Sézary circolanti o la valutare la presenza di linfociti atipici.

Diagnosi differenziale

La diagnosi differenziale è il punto cruciale per la corretta gestione del paziente affetto da MF. Nello stadio di chiazza e placca la diagnosi differenziale si pone con: la dermatite cronica, la psoriasi, la dermatite da contatto, l'eczema e la vitiligine. Per quanto riguarda la patologia in fase avanzata, la diagnosi differenziale può essere posta con: i linfomi a cellule B, i carcinomi cutanei, la sarcoidosi, la psoriasi, la dermatite atopica, la reazione a farmaci e la dermatite seborroica.

Altre possibili patologie poste in diagnosi differenziale sono: il linfoma cutaneo primitivo a cellule T CD8+ epidermotropo aggressivo, la papulosa linfomatoide, il linfoma cutaneo anaplastico a grandi cellule, la sindrome di Sézary ed altri [35].

Il riscontro dello stesso clone in lesioni di siti cutanei distanti suggerisce una MF piuttosto che un disordine infiammatorio.

Tabella 3. Diagnosi differenziale delle singole varianti di MF

Types of fungoides	Diagnosis differed
Folliculotropic	<p>Alopecic lesions on the scalp: alopecia areata, trichotillomania, cicatricial alopecias</p> <p>Erythematous lesions on the scalp: seborrheic dermatitis, atopic dermatitis, psoriasis</p> <p>Follicular spiky papules: keratosis pilaris, lichen spinulosus, pityriasis rubra pilaris, lichen planopilaris</p> <p>Hairless patches/flat plaques: alopecia mucinosa</p> <p>Acneiform lesions: Favre-Racouchot syndrome, chloracne, follicular-comedogenic graft-versus-host disease, rosacea, adult onset acne</p>
Hypopigmented	<p>Vitiligo, tinea corporis, tinea versicolor, pityriasis alba, postinflammatory hypopigmentation, progressive macular hypomelanosis, idiopathic guttate hypomelanosis, sarcoidosis, leprosy</p>
Hyperpigmented	<p>Postinflammatory hyperpigmentation, fixed drug eruption, pigmented contact dermatitis, erythema dyschromicum perstans (ashy dermatosis), cutaneous amyloidosis, atrophoderma of Pasini and Pierini, idiopathic eruptive macular hyperpigmentation</p>
Ichthyosiform	<p>Sarcoidosis as a specific cutaneous finding of the disease</p> <p>Conditions that are associated with acquired ichthyosis as a secondary finding</p>
Papular and pityriasis lichenoides chronica-like	<p>Lymphomatoid papulosis type B, pityriasis lichenoides chronica, persistent arthropod bite reactions, lymphomatoid drug eruption</p>
Palmaris et plantaris	<p>Dermatophyte infection, psoriasis, eczematous dermatitides, secondary syphilis, hyperkeratotic lichen planus, verrucae, granuloma annulare</p>
Psoriasiform	<p>Psoriasis</p>
Pagetoid reticulosis	<p>Papulosquamous, eczematoid, infectious or neoplastic diseases</p>
Unilesional	<p>Papulosquamous, eczematoid, or dermatophytic diseases, Bowen disease</p>
Poikilodermatous	<p>Acquired poikiloderma such as a manifestation of collagen vascular disease, or radiation dermatitis</p>

Types of mycosis fungoides	Diagnosis differed
Chronic pigmented purpura-like	Chronic pigmented purpura
Figurate erythema-like	Erythema annulare centrifugum, erythema gyratum repens, Lyme disease, fungal infection
Verrucous	Inflammatory linear verrucous epidermal nevus, palmoplantar hyperkeratosis, verrucae vulgaris, keratosis lichenoides chronica, keratoacanthoma, seborrheic keratosis, porokeratosis of Mibelli
Bullous	Bacterial or viral infections, autoimmune bullous disorders, drug eruption
Pustular	Infections, pustular psoriasis, drug eruption
Interstitial	Interstitial granuloma annulare, inflammatory stage of localized scleroderma, interstitial granulomatous dermatitis
Granulomatous	Benign granulomatous skin diseases
Other	Atopic dermatitis, generalized nonspecific dermatitis

Nel 2005 l'International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL), per facilitare la diagnosi di MF, ha proposto la valutazione combinata delle caratteristiche cliniche, istopatologiche, associate a quelle immunohistochimiche e al riarrangiamento dei geni del TCR.

Tabella 4. Algoritmo ISCL per la diagnosi precoce di MF

Criteria	Scoring system
Clinical	
<i>Basic</i>	2 points for basic criteria and two additional criteria
Persistent and/or progressive patches/thin plaques	1 point for basic criteria and one additional criterion
<i>Additional</i>	
1) Non-sun exposed location	

Criteria	Scoring system
2) Size/shape variation	
3) Poikiloderma	
Histopathologic	
<i>Basic</i>	2 points for basic criteria and two additional criteria
Superficial lymphoid infiltrate	1 point for basic criteria and one additional criterion
<i>Additional</i>	
1) Epidermotropism without spongiosis	
2) Lymphoid atypia [†]	
Molecular biological	
1) Clonal TCR gene rearrangement	1 point for clonality
Immunopathologic	
1) <50% CD2+, CD3+, and/or CD5+ T cells	1 point for one or more criteria
2) <10% CD7+ T cells	
3) Epidermal/dermal discordance of CD2, CD3, CD5, or CD7 [†]	

1.2.8 Stadiazione e prognosi

Una volta posta diagnosi di MF, diventa necessario scegliere correttamente l'approccio terapeutico. Alcuni studi hanno validato che oltre il 90% dei pazienti con MF in fase precoce non progrediscono alla fase tumorale e non presenteranno nella loro vita manifestazioni extracutanee di patologia [3,9].

Una corretta stadiazione prevede:

- Valutazione dell'intera superficie cutanea.
- Radiografia del torace.

- Ecografia dell'addome e dei linfonodi periferici maggiormente coinvolti come quelli cervicali, ascellari ed inguinali.
- Esami ematochimici: emocromo completo, valutazione degli enzimi epatici, funzionalità renale, livelli di LDH e la conta dei linfociti T.
- TC/PET-TC e analisi istologiche, immunoistochimiche e molecolari dei linfonodi e degli organi sospetti.

La stadiazione per la MF si sovrappone a quella della sindrome di Sézary e si ottiene seguendo la classificazione TNMB della ISCL/EORTC del 2007 [25]. Tale classificazione si basa sullo studio dei seguenti quattro parametri:

- Tumor (T): indica le dimensioni e l'estensione delle lesioni cutanee.
- Nodes (N): valuta il coinvolgimento dei linfonodi.
- Metastasis (M): valuta la presenza di metastasi.
- Blood (B): valuta la presenza di linfociti atipici nel sangue.

Tabella 5. Stadiazione della MF e della sindrome di Sézary

TNMB stages	
Skin	
T ₁	Limited patches, papules, and/or plaques covering < 10% of the skin surface. May further stratify into T _{1a} (patch only) vs T _{1b} (plaque ± patch).
T ₂	Patches, papules or plaques covering ≥ 10% of the skin surface. May further stratify into T _{2a} (patch only) vs T _{2b} (plaque ± patch).
T ₃	One or more tumors (≥ 1-cm diameter)
T ₄	Confluence of erythema covering ≥ 80% body surface area
Node	
N ₀	No clinically abnormal peripheral lymph nodes; biopsy not required
N ₁	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; histopathology Dutch grade 1 or NCI LN ₀₋₂
N _{1a}	Clone negative

TNMB stages	
N_{1b}	Clone positive
N₂	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; histopathology Dutch grade 2 or NCI LN ₃
N_{2a}	Clone negative
N_{2b}	Clone positive
N₃	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; histopathology Dutch grades 3-4 or NCI LN ₄ ; clone positive or negative
N_x	Clinically abnormal peripheral lymph nodes; no histologic confirmation
Visceral	
M₀	No visceral organ involvement
M₁	Visceral involvement (must have pathology confirmation and organ involved should be specified)
Blood	
B0	Absence of significant blood involvement: ≤ 5% of peripheral blood lymphocytes are atypical (Sézary) cells
B_{0a}	Clone negative
B_{0b}	Clone positive
B1	Low blood tumor burden: > 5% of peripheral blood lymphocytes are atypical (Sézary) cells but does not meet the criteria of B ₂
B_{1a}	Clone negative
B_{1b}	Clone positive

TNMB stages	
B2	High blood tumor burden: $\geq 1000/\mu\text{L}$ Sézary cells with positive clone

Il parametro T indica le dimensioni e l'estensione delle lesioni cutanee.

Il parametro N valuta l'estensione della patologia ai linfonodi locoregionali [90]. Tale valutazione biptica dei linfonodi è necessaria solo se questi mostrano alterazioni patologiche evidenti all'esame obiettivo. Esistono due modelli differenti per valutare il parametro N: il sistema olandese (Dutch system) e il sistema NCI-VA [91]. Il primo attribuisce maggiore rilevanza al riscontro di nuclei cerebriformi di dimensioni superiori a $7,5 \mu\text{m}$ e al sovvertimento dell'architettura linfonodale, mentre il secondo sistema considera più rilevante il numero di linfociti atipici anziché le dimensioni [92,93].

Il parametro M valuta la presenza di metastasi a distanza che possono essere ricercate tramite indagini quali: TC e PET-TC.

Il parametro B indica il coinvolgimento ematico della malattia e viene valutato tramite esami ematochimici completi, studio della clonalità del TCR e citometria a flusso del sangue periferico. In generale gli stadi precoci come: IA-IB-IIA presentano una sopravvivenza globale è di decenni. La maggior parte dei pazienti viene diagnosticata con la malattia in questo stadio. Gli stadi successivi vengono definiti come patologia in stadio avanzato: questi pazienti hanno una prognosi peggiore, con una mediana di sopravvivenza inferiore ai 5 anni.

Una volta diagnosticata la patologia deve essere rivalutata costantemente per poter ricalcolare la prognosi ed eventualmente modificare la terapia.

Tabella 6. Stadiazione SCL/EORTC Abbreviazioni: OS:Sopravvivenza generale; DSS: sopravvivenza malattia specifica; RDP: rischio di progressione della patologia.

Stage	TNMB classification				Median Years	OS 10-year (7)		
	T	N	M	B		OS (%)	DSS (%)	RDP (%)
IA	1	0	0	0,1	35.5	88	95	12
IB	2	0	0	0,1	21.5	70	77	38
IIA	1, 2	1	0	0,1	15.8	52	67	33
IIB	3	0- 2	0	0,1	4.7	34	42	58
IIIA	4	0- 2	0	0	4.7	37	45	62
IIIB	4	0- 2	0	1	3.4	25	45	73
IVA1	1- 4	0- 2	0	2	3.8	18	20	83
IVA2	1- 4	3	0	0- 2	2.1	15	20	80

Stage	TNMB classification				Median Years	OS 10-year (7)					
	T	N	M	B		OS (%)		DSS (%)		RDP (%)	
IVB	1- 4	0- 3	1	0- 2	1.4	18	(5	18	(5	82	(5
						years)		years)		years)	

La prognosi è influenzata sia dalla tipologia e dall'estensione del coinvolgimento cutaneo, dalla presenza infiltrato linfonodale e dalla presenza di lesioni viscerali. Solo nel 25% dei pazienti si avrà una progressione allo stadio avanzato.

La sopravvivenza a 5 anni per i pazienti con MF limitata alla cute varia dall'80% al 100%, mentre per quelli con coinvolgimento linfonodale è del 40%. La mediana di sopravvivenza varia notevolmente a seconda dello stadio della malattia [5]. Ad esempio la mediana di sopravvivenza per lo stadio IIB è di 86 mesi, mentre per lo stadio IVB è di 33 mesi.

Solo quattro variabili sono risultate fattori indipendenti di prognosi negativa: stadio IV, età superiore a 60 anni, trasformazione in linfoma a grandi cellule e aumento della lattato deidrogenasi (LDH) [4,20,94]. La combinazione di questi fattori serve da indice prognostico di patologia, che differenzia significativamente la sopravvivenza a 5 anni tra i diversi gruppi di pazienti.

Come appena discusso la prognosi tende a variare a seconda della variante della MF. La MF ipopigmentata e la reticolosi pagetoide hanno un'ottima prognosi mentre la FMF e la GSS tendono ad avere una prognosi peggiore [61,71]. I pazienti affetti da MF hanno un rischio maggiore rispetto alla popolazione generale verso lo sviluppo di altre neoplasie ematiche e non [93].

1.2.9 Terapia

Nel tempo sono state svolte diverse valutazioni genetiche volte a individuare target molecolari per terapie mirate, nonostante ciò la MF avanzata rimane una patologia per la quale non esistono terapie definitive in grado di garantirne la guarigione [85]. Il trattamento deve essere adattato allo stadio e all'estensione della malattia e richiede un approccio multidisciplinare che coinvolga: dermatologi, oncologi, ematologi e radiologi [95,97]. La terapia è sempre più specifica e personalizzata prendendo in considerazione: l'età, lo stato di salute del paziente, lo stadio della malattia, l'estensione del coinvolgimento cutaneo, i fattori prognostici negativi e le terapie precedenti [90]. Secondo il recente consensus di EORTC/ISCL e United States Cutaneous Lymphoma Consortium, la risposta alla terapia viene valutata utilizzando la variazione della mSWAT (modified Severity Weighted Assessment Tool) come parametro. Si definisce "risposta completa" la guarigione del 100% delle lesioni cutanee, "risposta parziale" una riduzione del 50%-99% delle lesioni senza la comparsa di nuove, "patologia stabile" una riduzione del 25%-50% delle lesioni senza nuove lesioni e "patologia in progressione" un aumento delle lesioni cutanee superiore al 25% o la comparsa di nuove lesioni [83]. Attualmente, il trattamento inizia con terapie locali singole o combinate seguite da modulatori della risposta biologica e quando necessario, da una sequenza di agenti chemioterapici, preferibilmente in combinazione e il più possibile in sequenza.

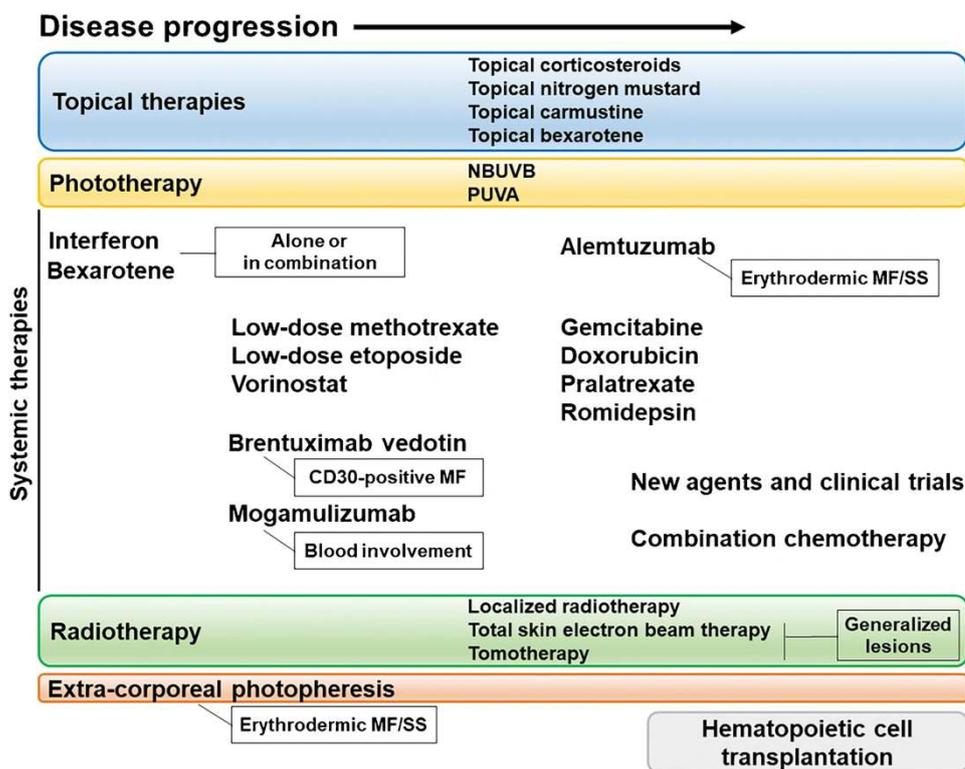


Figura 6. Algoritmo terapeutico per MF avanzata e la SS

Terapie topiche

Dato che la MF viene spesso diagnosticata in stadi precoci, l'obiettivo terapeutico è migliorare il quadro patologico e la sintomatologia riducendo al minimo la tossicità e gli effetti collaterali delle terapie. È importante notare che i pazienti in stadio IA hanno un'aspettativa di vita che non differisce da quella dei soggetti sani [35]. L'utilizzo rapido di una aggressiva terapia combinata con associazioni di terapie locali, radioterapie e chemioterapie topiche non ha dimostrato un reale beneficio né in termini di sopravvivenza complessiva né di sopravvivenza libera da malattia causando numerosi effetti collaterali [96]. Nei pazienti con massa limitata e lenta progressione della malattia può essere considerata la possibilità di effettuare sorveglianza attiva o una terapia topica di prima linea. L'approccio di prima linea si serve principalmente di: unguenti topiche a base di corticosteroidi, mostarde azotate, 8-metossipsolarene in associazione all'irradiazione UV-A (PUVA) o una combinazione di queste modalità [97]. Lo scopo di queste terapie è quello di indurre l'apoptosi dei linfociti maligni mediante danni al DNA delle cellule tumorali in rapida proliferazione facilitandone

l'eliminazione specifica. La CRR (Complete Response Rate) è compresa tra il 60% e il 100% [52]. Gli steroidi topici hanno dimostrato un'ottima risposta negli stadi iniziali con minimi effetti collaterali, quali atrofia cutanea e sviluppo di teleangectasie.

Tra le mostarde azotate, la mecloretamina è attualmente la più utilizzata [98]. Questi agenti alchilanti con effetto antimitotico hanno dimostrato una sicurezza a lungo termine e non hanno mostrato assorbimento sistemico significativo o complicanze sistemiche se non una dermatite irritativa da contatto [20,99]. Imiquimod e Resiquimod sono farmaci innovativi appartenenti alla famiglia delle Imidazoquinoline. Questi, agendo come agonisti dei Toll-like receptor (TLR), inducono la sintesi e il rilascio di citochine quali: INF- α , TNF- α , IL-6 e IL-12 attivando la risposta immunitaria adattativa e l'attacco al tumore dal sistema immunitario. Gli effetti collaterali più comuni riscontrati in seguito alla terapia sono: dolore, eritema, ulcerazione e sintomi simil-influenzali. La fototerapia è la terapia di seconda istanza per i pazienti con in uno stadio precoce di malattia dove le terapie topiche non sono risultate efficaci. Le chiazze possono essere trattate con raggi UVB a banda stretta (NB-UVB), mentre le placche o le chiazze refrattarie vengono trattate con i raggi UVA in associazione all'8-metilpsolarene (PUVA). Gli effetti collaterali della fototerapia includono il foto-danneggiamento cutaneo e un aumento del rischio di neoplasie cutanee [98]. I retinoidi di prima generazione, come l'isotretinoina hanno effetti limitati sulla MF. Il retinoide sintetico Bexarotene si lega al Retinoid-X-Receptor (RXR) con alta selettività e ha dimostrato risposta terapeutica in pazienti in tutti gli stadi della malattia. Gli effetti collaterali più comuni di questi farmaci includono: ipertrigliceridemia, ipercolesterolemia, neutropenia e ipotiroidismo centrale. Per monitorare gli effetti collaterali, i pazienti devono essere sottoposti a controlli mensili. Se i pazienti traggono beneficio da questo trattamento, è consigliabile continuare la terapia fino alla progressione della malattia [27,100,104]. Le cellule della micosi fungoide sono spesso sensibili all'effetto tossico indotto dalla radiazione. Se le lesioni sono diffuse, refrattarie o rapidamente progressive, si preferisce la Total Skin Electron Beam Therapy (TSEBT), considerata la terapia topica più efficace. La TSEBT è comunemente riservata ai pazienti con coinvolgimento cutaneo diffuso, placche estese, palliazione della sindrome di Sézary o precedente al trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche non ablativo. Gli effetti collaterali includono una

maggior predisposizione allo sviluppo di nuove neoplasie cutanee, eritema e perdita dei capelli [105].

In caso di singolo approccio palliativo alla malattia la radioterapia risulta essere un'ottima scelta per il miglioramento della qualità della vita dei pazienti.

Terapie sistemiche

Attualmente non esiste una terapia che conduca alla guarigione per gli stadi avanzati della micosi fungoide (MF). Dopo il ciclo di terapia, i pazienti recidivano frequentemente e richiedono cure continue. Anche se esiste una vasta gamma di trattamenti sistemiche disponibili, la risposta clinica è spesso breve e il trapianto di cellule staminali ematopoietiche rimane l'unica opzione curativa [106,107].

Inibitori dell'istone-deacetilasi (iHDAC): Questi farmaci agiscono riducendo la trascrizione di proteine fondamentali nella genesi tumorale attraverso un processo di repressione epigenetica. Attualmente, i due farmaci approvati dalla FDA sono il Vorinostat e la Romidepsina. Gli effetti indesiderati includono gastropatie e pancitopenie. Occasionalmente si osserva un prolungamento dell'intervallo QT per cui è necessario monitorare i pazienti attraverso elettrocardiogrammi ripetuti.

Interferone- α (IFN- α): Questo farmaco ha mostrato effetti pleiotropici nell'ambiente tumorale, aiutando a ripristinare la risposta immunitaria tipica delle fasi iniziali dei linfomi cutanei a cellule T. La risposta a questo farmaco è graduale e può richiedere da 3 a 6 mesi per ottenere la massima risposta [108]. A causa della sua buona efficacia e della bassa tossicità viene scelto come trattamento di prima linea negli stadi avanzati di MF.

La tossicità a lungo termine di maggior preoccupazione è quella che coinvolge le strutture encefaliche con rischio di: depressione, neuropatia, demenza e mielopatia oltre ad altri effetti tossici a livello di fegato, tiroide e midollo osseo [90,107].

Fotoferesi extracorporea (ECP): Prevede l'esposizione del plasma del paziente a 8-metossipsolarene in presenza di luce UVA all'interno di un circuito extracorporeo, successivamente al quale avviene la reinfusione delle cellule irradiate. Questo metodo sfrutta la fotoreattività dello psolarene, che si lega al DNA quando esposto ai raggi UVA, inducendo l'apoptosi della maggior parte dei linfociti e stimolando una risposta immunitaria contro il tumore. È raccomandato come terapia di prima linea per la MF

eritrodermica e per la sindrome di Sézary [109]. Il trattamento prevede due sedute in due giorni consecutivi ogni 4 settimane. Gli effetti collaterali sono pochi tra cui il più comune è l'anemia sideropenica [110].

Terapia mirata:

- Alemtuzumab: un anticorpo monoclonale umanizzato contro il CD52, espresso dalla maggior parte dei linfociti T, B e NK. La percentuale di risposta varia dal 50% al 70%, ed è maggiore nei pazienti affetti da sindrome di Sézary [56].
- Brentuximab-Vedotin: un anticorpo monoclonale anti-CD30 coniugato con un farmaco antimitotico antitubulare [52]. La risposta globale è stata intorno al 70% dei pazienti.
- Mogamulizumab: un anticorpo anti-CCR4 utilizzato quando le terapie di prima linea non hanno avuto l'effetto desiderato [90].

Chemioterapia sistemica: Viene utilizzata principalmente nei pazienti con malattia bulky, coinvolgimento linfonodale o viscerale esteso, patologie rapidamente progressive o refrattarie alle terapie di prima linea. La recidiva di malattia è comune con un tasso di quasi il 90% entro il primo anno dal termine del ciclo chemioterapico. Alcuni dei chemioterapici più utilizzati sono la gemcitabina, la doxorubicina liposomiale, il pralatrexato e la romidepsina [111-115].

Trapianto di cellule staminali ematopoietiche allogeniche: Anche se comporta un'alta tossicità (si stima un tasso di mortalità del 25-30%), questo trattamento è promettente e rappresenta l'unica opzione potenzialmente curativa per gli stadi avanzati di patologia, specialmente nei pazienti che non sono stati adeguatamente pretrattati. Questa terapia risulta efficace in quanto sfrutta il graft-versus-lymphoma (GvL) [116], ed è per questo che il trapianto allogenico si è dimostrato molto più efficace del trapianto autologo.

Terapia di mantenimento

Nel caso in cui venisse raggiunta la remissione, la fase di mantenimento prevede dosi e frequenza di terapia minori. Le terapie di mantenimento descritte includono:

- PUVA (Psoralene e UV-A): prevede l'utilizzo di psoralene seguito dall'esposizione alla luce UV-A.
- Applicazione topica di mostarde azotate.
- Fotoferesi extracorporea (ECP).
- Utilizzo di IFN- α : utilizzato anche in fase di mantenimento.

Durante questa fase, la cute sana è coinvolta e esposta come parte integrante del raggiungimento della remissione. La terapia di mantenimento risulta essere efficace ogni qual volta si riesce ad interrompere il reclutamento cutaneo delle cellule neoplastiche. La guarigione è definita come un intervallo di tempo libero da malattia di almeno 8 anni [98,117]. Dall'analisi dei follow-up dei pazienti trattati, emerge che dopo un periodo di 5-8 anni, le recidive tardive sono estremamente rare. In caso di recidiva successiva a una remissione, questa può essere trattata precocemente all'utilizzo aggressivo di glucocorticoidi topici.

2. SCOPO DELLO STUDIO

La finalità di questo studio in vitro è esaminare, su una linea di linfociti T di micosi fungoide, l'effetto dell'immunoterapia utilizzando coniugati anticorpo-farmaco (antibody-drug conjugates, ADC). In particolare, è stata posta l'attenzione sulla possibilità di usare l'antigene di superficie CLA, come target terapeutico per MF, in combinazione con monomethyl-auristatin-E (MMAE), un agente antineoplastico. Per raggiungere questo obiettivo è stata misurata in vitro la vitalità di linee cellulari dopo incubazione con MMAE, anticorpo anti CLA e il coniugato MMAE-antiCLA. In secondo luogo, è stata valutata la internalizzazione del recettore nelle cellule bersaglio.

3. MATERIALI E METODI

Internalizzazione del coniugato MMAE+ Anti-CLA-Ab

Per valutare nuove possibili strategie terapeutiche per il trattamento della MF in vitro, abbiamo utilizzato la linea cellulare MyLa CD4⁺ (Merck, Codice Catalogo 95051033), originata da una biopsia cutanea di un paziente con MF in fase di placca, con sierologia negativa per HTLV-1. Le linee cellulari cancerose immortalizzate derivate da pazienti, sebbene difficili da propagare in coltura, sono semplici da usare e offrono piattaforme primarie per analizzare i percorsi molecolari legati alla trasformazione maligna e identificare le vulnerabilità intrinseche delle cellule cancerose per scopi di screening farmacologico. Le cellule di CTCL sono state studiate approfonditamente per esplorare le somiglianze genomiche e trascrittomiche sia tra le linee cellulari stesse che tra le linee cellulari e i campioni dei pazienti. Coltiviamo regolarmente diverse linee cellulari di linea T in terreno RPMI 1640 (Euroclone) integrato con il 10% di siero fetale bovino (FBS, Sial), 2 mM di L-glutamina, 100 U/L di penicillina e 20 U/L di streptomina ('RPMI'). Poiché la scheda tecnica delle cellule MyLa CD4⁺ indicava la necessità di integrare il terreno di coltura con siero umano e citochine (IL-2 e IL-4), inizialmente le abbiamo coltivate con questi componenti aggiuntivi, adattandole gradualmente alla crescita in RPMI.

Le cellule MyLa crescono in sospensione formando aggregati cellulari caratteristici, indice di buona vitalità. La concentrazione ideale di semina, tra 300.000 e 900.000 cellule/ml, è stata determinata allestendo colture a diverse concentrazioni. La vitalità cellulare è stata valutata etichettando le cellule con Trypan Blue allo 0,4%, un colorante vitale di esclusione che, entrando nelle cellule con membrana citoplasmatica compromessa, colora solo le cellule morte, distinguendole da quelle vive. Le cellule MyLa sono state coltivate in un incubatore per colture tissutali umidificato, a 37°C, in un'atmosfera satura di acqua con il 5% di CO₂.

Coniugazione di anticorpo monoclonale anti-CLA con MMAE

La monometil auristatina E (MMAE) è stata coniugata all'anticorpo CLA (Mal-VC-PAB-MMAE) utilizzando un kit della CellMosaic Inc. (Woburn, MA, USA) seguendo le istruzioni del produttore.

Figura 7. Anticorpo monoclonale anti-CLA e MMAE legati insieme tramite il linker rilasciabile Val-Cit-PAB.

Saggio di morte cellulare

Description of the Material:

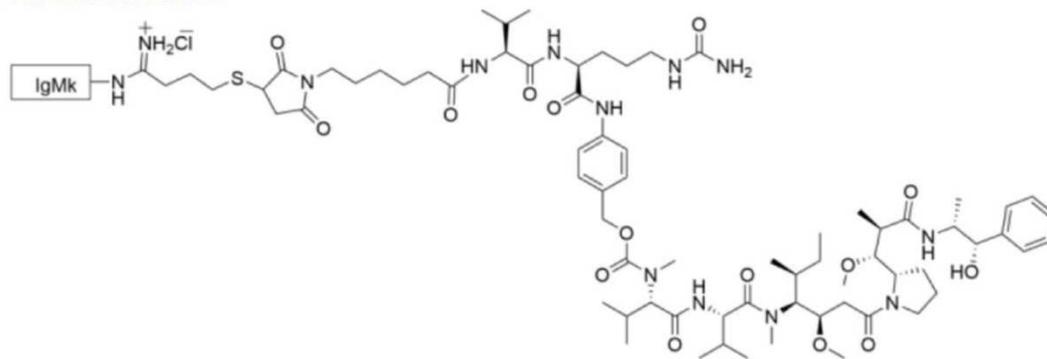
(a) **Chemical Name:** IgMk-VC-PAB-MMAE

(b) **Project Number:** 5404

(c) **Starting Material Source 1:** CLA Antibody from Miltenyi Biotec, Cat# 130-092-629, Lot# 5220505662

(d) **Starting Material Source 2:** Mal-VC-PAB-MMAE from CellMosaic. Stock#: CM11001, Lot#: s396.s3.0330B

(e) **Conjugation chemistry:** Antibody IgMk and MMAE are linked together via releasable Val-Cit-PAB Linker.



Dopo 24 ore di trattamento con i singoli composti o con le loro combinazioni, aliquote di cellule sono state etichettate con 2 µg/ml di ioduro di propidio (PI) e 2 µl di annessina V coniugata con il fluoroforo Alexa 647 (Thermo Fisher Scientific) in 300 µl di terreno RPMI per 10 minuti a temperatura ambiente, e successivamente analizzate tramite citometria a flusso. Il PI è un composto chimico che può penetrare esclusivamente nelle cellule con una membrana cellulare danneggiata, legandosi in modo stechiometrico al DNA nucleare. L'annessina V, invece, si lega alla fosfatidilserina, esposta sulla superficie esterna della membrana delle cellule apoptotiche.

Le cellule vive sono negative sia per PI che per annessina V; le cellule in apoptosi precoce sono positive per annessina V e negative per PI; mentre la positività sia per annessina V che per PI indica apoptosi tardiva. Le cellule necrotiche sono positive solo per PI. La morte cellulare specifica riportata nelle figure è stata calcolata con la seguente formula: $SCD = [(CDT - CDNT) / (100 - CDNT)] \times 100$, dove CDT indica la

percentuale di cellule morte nei campioni trattati e CDNT indica la percentuale di cellule morte nei campioni di controllo.

Analisi statistica e preparazione delle figure

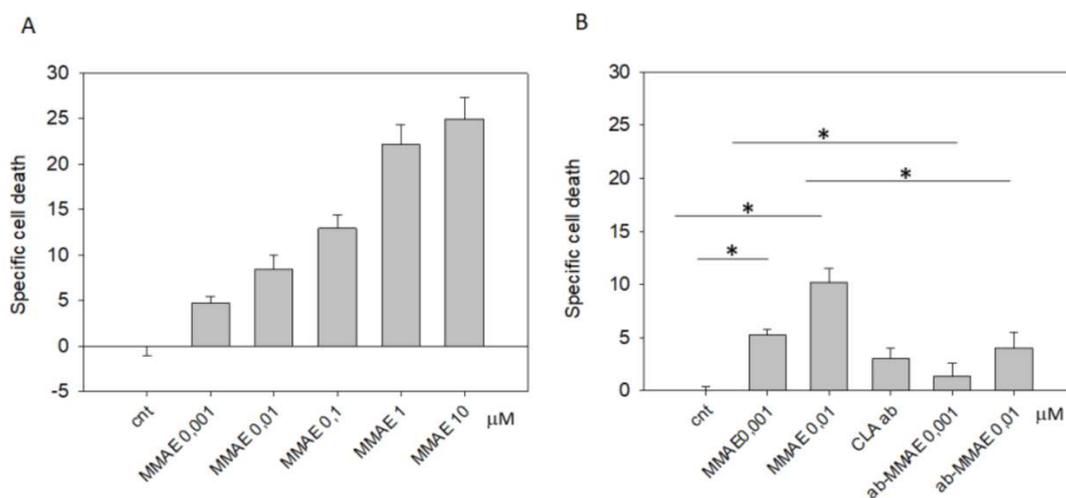
La significatività statistica è stata valutata utilizzando il test non parametrico di Mann-Whitney calcolato con il software SigmaPlot versione 13.0 (Systat Software, Inc.). La significatività statistica è stata considerata con $p < 0,05$. I grafici sono stati generati utilizzando SigmaPlot versione 13.0.

4. RISULTATI

Morte cellulare indotta da MMAE e trattamento MMAE+ Anti-CLA-Ab

La maggior parte dei farmaci citotossici utilizzati nella farmacoterapia del cancro non si localizza preferenzialmente nel sito tumorale, causando tossicità indesiderate che limitano l'aumento delle dosi. Questo problema può essere superato mediante il legame del farmaco a una molecola che si legherà in modo selettivo e sarà assorbita dalle cellule tumorali. Il MMAE è un agente antimitotico che inibisce la divisione cellulare bloccando la polimerizzazione della tubulina. Abbiamo cercato di rendere la citotossicità del MMAE specifica per le cellule di MF coniugandolo a un anticorpo monoclonale (ab) che riconosce l'Antigene Linfocitario Cutaneo (CLA), un recettore di *homing* caratteristico espresso dalle cellule di MF. Per valutare la capacità del coniugato anticorpo-farmaco (ADC) di indurre la morte cellulare, le cellule MyLa sono state trattate con MMAE, CLA-ab o ADC (ab-MMAE) alle concentrazioni indicate in Figura 8. I risultati hanno mostrato che il MMAE è stato in grado di indurre la morte nelle cellule MyLa in modo dose-dipendente (Figura 8A, pannello sinistro). Tuttavia, l'ADC ha mostrato un'attività citotossica inferiore rispetto al MMAE o al CLA-ab da solo (Figura 8B, pannello destro).

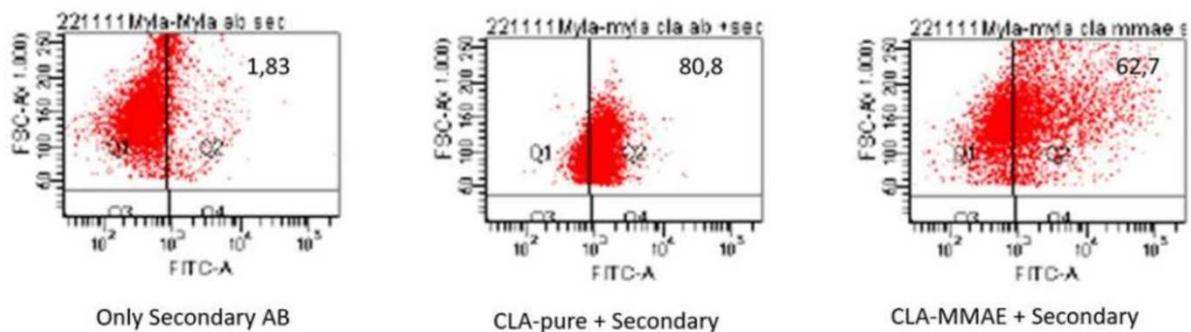
Figura 8. Trattamento delle cellule MyLa con MMAE e ab-MMAE. Il pannello sinistro (A) mostra la morte delle cellule MyLa, calcolata come morte cellulare specifica, dopo 24 ore di trattamento con dosi crescenti di MMAE (indicate in μM). Il pannello destro (B) mostra la morte indotta da MMAE e CLA-ab utilizzati come agenti singoli, confrontati con l'ADC (ab-MMAE). Le differenze statisticamente significative tra le cellule di controllo e le cellule trattate con MMAE o ab-MMAE sono state calcolate utilizzando il test di Mann-Whitney non parametrico.



Questo risultato indica che il coniugato ab-MMAE si legava alla superficie cellulare, ma forse non veniva efficacemente internalizzato nelle cellule.

La scarsa attività citotossica riscontrata per ab-MMAE ci ha spinto a verificare se le cellule MyLa legassero l'ADC e se questo venisse internalizzato. Per questo motivo, abbiamo incubato le cellule MyLa con CLA-ab o ab-MMAE per 72 ore. Successivamente, le cellule sono state lavate e incubate con un anticorpo secondario coniugato con FITC per essere analizzate tramite citometria a flusso. Come mostrato nella Figura 9, le percentuali di cellule FITC-positive sono risultate più alte sia nel campione trattato con CLA-ab (80,8%) che in quello trattato con ab-MMAE (62,7%) rispetto al controllo non trattato (1,83%). Questo risultato suggerisce che il coniugato ab-MMAE si lega alla superficie cellulare, ma probabilmente non viene internalizzato in modo efficiente nelle cellule.

Figura 9. Rilevamento di CLA e CLA-MMAE sulle cellule MyLa. Le cellule MyLa sono state coltivate per 72 ore con CLA-ab e ab-MMAE e quindi etichettate con l'anticorpo secondario coniugato a FITC per 1 ora a temperatura ambiente. Le cellule positive per CLA sono state rilevate tramite citometria a flusso.



5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La micosi fungoide (MF) è il sottotipo più comune di PCL a cellule T, al quale si associa un decorso clinico indolente che progredisce attraverso tre stadi: chiazza, placca e nodulo tumorale. Le terapie attuali si basano sullo stadio della malattia e sull'età del paziente al momento della diagnosi. Nei primi stadi, i trattamenti topici danno buoni risultati, sebbene il 30% dei pazienti progredisca verso fasi più avanzate. Nei casi avanzati, si utilizzano terapie sistemiche o combinate, con una prognosi generalmente sfavorevole. Recentemente, sono stati proposti vari approcci immunoterapici alternativi alle terapie convenzionali. Alcuni anticorpi monoclonali, come Alemtuzumab, Brentuximab Vedotin e Mogamulizumab, mirano ad antigeni comuni a tutti i linfociti T, causando numerosi effetti collaterali, talvolta gravi. Non ci sono prove che terapie più aggressive (in particolare la polichemioterapia) prolunghino la sopravvivenza. Inoltre, nelle fasi avanzate, le terapie raramente forniscono risposte durature e l'unica cura potenziale è il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, per il quale molti pazienti non sono idonei a causa dell'alta morbilità e mortalità.

Nuovi bersagli molecolari per la MF includono CLA e CCR4. CCR4 è cruciale per il traffico cutaneo delle cellule T ed è espresso sulle cellule T maligne. Mogamulizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato che inibisce CCR4, è stato approvato per i pazienti con CTCL che hanno ricevuto almeno una terapia sistemica precedente. Ha dimostrato un miglioramento significativo della sopravvivenza libera da progressione rispetto a Vorinostat. Tuttavia, può causare gravi effetti avversi, come reazioni all'infusione e complicazioni autoimmuni, e aumenta il rischio di malattia graft versus host nel contesto del trapianto allogenico.

Brentuximab vedotin (BV) è un ADC che prende di mira le cellule cancerose CD30-positivo. Questo ADC è composto da un anticorpo monoclonale chimerico anti-CD30 di tipo IgG1 coniugato a un inibitore dei microtubuli (monometil auristatina E, MMAE) tramite un linker scindibile. Dopo l'internalizzazione, l'ADC viene scisso nei

lisosomi, rilasciando MMAE, che inibisce la polimerizzazione della tubulina, portando alla morte cellulare programmata.

Il CD30 appartiene alla famiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale ed è coinvolto nella risposta immunitaria dei linfociti T e nella regolazione [118]. Questo recettore è universalmente espresso nel linfoma di Hodgkin classico e nel linfoma anaplastico a grandi cellule; è variabilmente espresso nel PCALCL e nella LyP, ma anche nei linfomi a cellule B come il DLBCL, e in altri CTCL come la MF [119,120]. BV è ora indicato per il trattamento di pazienti adulti con CTCL CD30+ dopo almeno una terapia sistemica precedente. Il farmaco si è dimostrato efficace in diversi studi clinici: in uno studio di fase II multi-istituzionale, BV è stato somministrato a 32 pazienti con MF o SS (stadi IB-IVB) con espressione variabile di CD30; tutti avevano fallito almeno una terapia sistemica. Il tasso di risposta obiettiva era circa il 70%, dimostrando un'efficacia significativa. Un'espressione più alta di CD30 (>5%) era associata a una migliore risposta rispetto a un'espressione più bassa (<5%) [121]. Nel trial ALCANZA di fase III multicentrico, randomizzato, in aperto, BV ha mostrato una risposta più duratura rispetto a metotrexato o bexarotene in 128 pazienti pretrattati con MF o PCALCL CD30+. Nei pazienti con MF, il tasso di risposta obiettiva di quattro mesi era del 50% nel gruppo BV rispetto al 10% nel gruppo bexarotene/metotrexato; nei pazienti con PCALCL, il tasso era del 75% nel gruppo BV rispetto al 20% nel gruppo bexarotene/metotrexato. L'analisi finale del trial ALCANZA, dopo un follow-up mediano di 45,9 mesi, ha confermato i risultati primari, evidenziando la superiorità del BV rispetto a bexarotene/metotrexato [122,123]. Nel complesso, BV mostra un profilo di sicurezza favorevole. L'evento avverso più comune è la neuropatia periferica, dovuta non a un meccanismo mediato dal CD30, ma all'inibizione del trasporto assonale dipendente dai microtubuli mediata da MMAE. Altri eventi avversi comuni sono affaticamento, nausea, infezioni del tratto respiratorio superiore e neutropenia [118,124,125]. Nonostante l'efficacia e il profilo di sicurezza, la resistenza a BV è un evento riconosciuto con meccanismi caratterizzati. La resistenza può essere dovuta a una downregolazione del target CD30, un accumulo intracellulare alterato di MMAE o una sovraespressione di trasportatori P-glicoproteina, codificata dalla resistenza multipla ai farmaci-1 (MDR1) che esportano agenti citotossici fuori dalla cellula [126]. Per superare la resistenza o migliorare la

risposta a BV, sono attualmente esplorate due principali strategie: la combinazione del BV con altri farmaci e l'identificazione di nuovi antigeni target.

L'anticorpo umanizzato efalizumab è stato l'unico farmaco biologico diretto verso le cellule T approvato per il trattamento della psoriasi da moderata a grave. Legandosi e bloccando la funzione della molecola di adesione antigene associato alla funzione dei leucociti 1 (LFA-1), interferisce con l'attivazione delle cellule T nel linfonodo, la migrazione attraverso la circolazione verso la pelle e la riattivazione in loco, tutti passaggi centrali nella patogenesi della psoriasi. I ligandi per LFA-1 sono le molecole di adesione intercellulare (ICAM) [127]. Queste includono ICAM-1, espressa su leucociti, cellule dell'endotelio vascolare e cellule epiteliali, inclusi i cheratinociti, ICAM-2 espressa sull'endotelio e sui linfociti a riposo e ICAM-3, espressa su monociti e linfociti a riposo. LFA-1 è probabilmente coinvolto in numerosi passaggi cruciali della patogenesi della psoriasi, ovvero l'attivazione delle cellule T nei linfonodi al momento dell'incontro con l'antigene trasportato lì dalle cellule dendritiche dell'epidermide, l'extravasazione delle cellule T circolanti nella pelle infiammata, la riattivazione delle cellule T nella pelle da parte delle cellule presentanti l'antigene e l'interazione dei cheratinociti con le cellule T attivate infiltranti. Pertanto, un anticorpo anti-LFA-1 che blocca la funzione dovrebbe mostrare efficacia anti-psoriasica interferendo in questi punti. Nonostante l'efficacia e la relativa mancanza di effetti collaterali gravi nell'utilizzo in acuto sia stata validata da diversi studi clinici, il farmaco è stato ritirato dal commercio in seguito all'identificazione di causalità diretta tra il suo l'utilizzo e lo sviluppo di leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), una rara e potenzialmente fatale malattia demielinizzante che colpisce principalmente gli individui immunocompromessi [128].

Target molecolare specifico simile al LFA-1 ipotizzato nel trattamento della MF è il CLA: recettore dell'homing per le cellule immunitarie cutanee che interagisce con l'E-selectina sulle cellule endoteliali. Un approccio con anticorpi monoclonali anti-CLA coniugati a MMAE ha dimostrato una bassa attività citotossica in vitro, probabilmente dovuta alla mancanza di internalizzazione dell'ADC nelle cellule. Tuttavia, in vivo, gli anticorpi non internalizzanti possono rilasciare MMAE nella matrice extracellulare subendoteliale, suggerendo una potenziale efficacia antitumorale. Sebbene CLA sia un

promettente bersaglio terapeutico per la MF, non tutte le cellule tumorali lo esprimono e la sua espressione diminuisce con la progressione della malattia. CLA è anche presente nelle cellule T sane della pelle, il che potrebbe portare a effetti collaterali derivanti dall'alterazione del sistema immunitario cutaneo. Nonostante ciò, a differenza del trattamento con efalizumab per la psoriasi, una malattia infiammatoria in cui la prognosi e la sopravvivenza sono state compromesse dall'uso del farmaco, nel caso della MF la sopravvivenza e la prognosi sono notevolmente peggiori. Questo permette di considerare l'utilizzo di farmaci come gli anticorpi anti-CLA coniugati a MMAE, nonostante il rischio di effetti avversi, come osservato con l'efalizumab.

Nel nostro lavoro abbiamo cercato di rendere la citotossicità del MMAE specifica per le cellule di MF coniugandolo a un anticorpo monoclonale (ab) che riconosce l'Antigene Linfocitario Cutaneo (CLA). I risultati hanno mostrato che il MMAE è stato in grado di indurre la morte nelle cellule MyLa in modo dose-dipendente. Tuttavia, l'ADC ha mostrato un'attività citotossica inferiore rispetto al MMAE o al CLA-ab da solo. Questo risultato indica che il coniugato ab-MMAE si legava alla superficie cellulare, ma forse non veniva efficacemente internalizzato nelle cellule.

La scarsa attività citotossica riscontrata per ab-MMAE ci ha spinto a verificare se le cellule MyLa legassero l'ADC e se questo venisse internalizzato. Per questo motivo, abbiamo incubato le cellule MyLa con CLA-ab o ab-MMAE per 72 ore. Le cellule FITC-positive sono risultate più alte sia nel campione trattato con CLA-ab (80,8%) che in quello trattato con ab-MMAE (62,7%) rispetto al controllo non trattato (1,83%). Questo risultato suggerisce che il coniugato ab-MMAE si lega alla superficie cellulare, ma probabilmente non viene internalizzato in modo efficiente nelle cellule.

Un ulteriore avanzamento nelle terapie mirate è rappresentato dalla fotoimmunoterapia nel vicino infrarosso (NIR-PIT). Questo metodo utilizza una molecola fotoinducibile nel vicino infrarosso collegata a un anticorpo monoclonale (mAb) che prende di mira un antigene tumorale specifico, formando un coniugato anticorpo-fotoassorbitore (APC) attivato dalla luce NIR. In questo modo, solo le cellule tumorali legate all'APC e esposte alla luce NIR vengono eliminate, limitando il danno alle cellule normali vicine. Inoltre, è stato osservato che la NIR-PIT stimola una potente risposta

immunitaria che contribuisce ulteriormente all'eliminazione delle cellule tumorali o del microambiente tumorale [129,130].

Ulteriori studi hanno valutato la NIR-PIT (Near Infrared Photoimmunotherapy) nella MF prendendo di mira il CLA, che è espresso nelle cellule T della memoria effettrici residenti nella pelle della MF. In particolare, le cellule MF sono state incubate con un mAb anti-CLA coniugato con la ftalocianina idrofila IRdye 700DX® (IR700) e successivamente irradiate con luce NIR. È stato osservato un effetto di eliminazione molto modesto utilizzando solo il mAb anti-CLA o solo la luce, mentre la combinazione dei due ha portato a un sostanziale aumento della morte nelle linee cellulari MF, senza danneggiare le cellule negative per CLA [131].

Infine, risultati simili sono stati ottenuti su modelli murini di BCL esprimenti CD20 utilizzando rituximab coniugato con IR700 [132]. Questi risultati preliminari forniscono la prova di concetto per lo sviluppo futuro di approcci basati su NIR-PIT nella gestione del linfoma cutaneo.

BIBLIOGRAFIA

1. Kempf W, Mitteldorf C. Cutaneous T-cell lymphomas-An update 2021. *Hematol Oncol.* 2021;39 Suppl 1:46–51.
2. Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, Jaffe ES. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood.* 18 aprile 2019;133(16):1703–14.
3. Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, Meijer CJLM. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood.* 15 maggio 2005;105(10):3768–85.
4. Van Doorn R, Scheffer E, Willemze R. Follicular mycosis fungoides, a distinct disease entity with or without associated follicular mucinosis: a clinicopathologic and follow-up study of 51 patients. *Arch Dermatol.* febbraio 2002;138(2):191–8.
5. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, Mitchell TJ, Cox M, Ferreira S, Robson A, Calonje E, Stefanato CM, Wain EM, Wilkins B, Fields PA, Dean A, Webb K, Scarisbrick J, Morris S, Whittaker SJ. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sézary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1° novembre 2010;28(31):4730–9.
6. Hwang ST, Janik JE, Jaffe ES, Wilson WH. Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Lancet Lond Engl.* 15 marzo 2008;371(9616):945–57.
7. Bekkenk MW, Geelen FA, van Voorst Vader PC, Heule F, Geerts ML, van

Vloten WA, Meijer CJ, Willemze R. Primary and secondary cutaneous CD30(+) lymphoproliferative disorders: a report from the Dutch Cutaneous Lymphoma Group on the long-term follow-up data of 219 patients and guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 15 giugno 2000;95(12):3653–61.

8. Kempf W, Pfaltz K, Vermeer MH, Cozzio A, Ortiz-Romero PL, Bagot M, Olsen E, Kim YH, Dummer R, Pimpinelli N, Whittaker S, Hodak E, Cerroni L, Berti E, Horwitz S, Prince HM, Guitart J, Estrach T, Sanches JA, Duvic M, Ranki A, Dreno B, Ostheeren-Michaelis S, Knobler R, Wood G, Willemze R. EORTC, ISCL, and USCLC consensus recommendations for the treatment of primary cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorders: lymphomatoid papulosis and primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 13 ottobre 2011;118(15):4024–35.

9. Cerroni L. Past, present and future of cutaneous lymphomas. *Semin Diagn Pathol*. gennaio 2017;34(1):3–14.

10. Willemze R, Hodak E, Zinzani PL, Specht L, Ladetto M, ESMO Guidelines Committee. Primary cutaneous lymphomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 ottobre 2018;29(Suppl 4):iv30–40.

11. Park JH, Shin HT, Lee DY, Lee JH, Yang JM, Jang KT, Ko YH. World Health Organization-European Organization for Research and Treatment of Cancer classification of cutaneous lymphoma in Korea: a retrospective study at a single tertiary institution. *J Am Acad Dermatol*. dicembre 2012;67(6):1200–9.

12. Tan SH, Sim CS, Ong BH. Cutaneous lymphomas other than mycosis fungoides in Singapore: a clinicopathological analysis using recent classification systems. *Br J Dermatol*. settembre 2003;149(3):542–53.

13. Vermeer M. Epidemiology of cutaneous lymphoma. *Br J Dermatol.* giugno 2021;184(6):993–4.
14. Criscione VD, Weinstock MA. Incidence of cutaneous T-cell lymphoma in the United States, 1973-2002. *Arch Dermatol.* 143(7):854–9.
15. Markova A, Weinstock MA. Trends in cutaneous lymphoma epidemiology. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* settembre 2010;10 Suppl 2:S63-66.
16. Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood.* 21 maggio 2009;113(21):5064–73.
17. Burg G, Dummer R, Haeffner A, Kempf W, Kadin M. From inflammation to neoplasia: mycosis fungoides evolves from reactive inflammatory conditions (lymphoid infiltrates) transforming into neoplastic plaques and tumors. *Arch Dermatol.* luglio 2001;137(7):949–52.
18. Stadler R, Stranzenbach R. Molecular pathogenesis of cutaneous lymphomas. *Exp Dermatol.* ottobre 2018;27(10):1078–83.
19. Miyagaki T. Diagnosis and prognostic stratification of cutaneous lymphoma. *J Dermatol.* febbraio 2022;49(2):210–22.
20. Kim YH, Liu HL, Mraz-Gernhard S, Varghese A, Hoppe RT. Long-term outcome of 525 patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome: clinical prognostic factors and risk for disease progression. *Arch Dermatol.* luglio 2003;139(7):857–66.
21. Guitart J, Magro C. Cutaneous T-cell lymphoid dyscrasia: a unifying term for idiopathic chronic dermatoses with persistent T-cell clones. *Arch Dermatol.* luglio 2007;143(7):921–32.

22. Holm N, Flaig MJ, Yazdi AS, Sander CA. The value of molecular analysis by PCR in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol*. settembre 2002;29(8):447–52.
23. Specht L, Skov L. Cutaneous Lymphomas. *Clin Oncol R Coll Radiol G B*. novembre 2019;31(11):797–807.
24. Barrington SF, Mikhaeel NG, Kostakoglu L, Meignan M, Hutchings M, Müeller SP, Schwartz LH, Zucca E, Fisher RI, Trotman J, Hoekstra OS, Hicks RJ, O’Doherty MJ, Hustinx R, Biggi A, Cheson BD. Role of imaging in the staging and response assessment of lymphoma: consensus of the International Conference on Malignant Lymphomas Imaging Working Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 settembre 2014;32(27):3048–58.
25. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, Zackheim H, Duvic M, Estrach T, Lamberg S, Wood G, Dummer R, Ranki A, Burg G, Heald P, Pittelkow M, Bernengo MG, Sterry W, Laroche L, Trautinger F, Whittaker S, ISCL/EORTC. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sézary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood*. 15 settembre 2007;110(6):1713–22.
26. Stadler R, Otte HG, Luger T, Henz BM, Köhl P, Zwingers T, Sterry W. Prospective randomized multicenter clinical trial on the use of interferon -2a plus acitretin versus interferon -2a plus PUVA in patients with cutaneous T-cell lymphoma stages I and II. *Blood*. 15 novembre 1998;92(10):3578–81.
27. Straus DJ, Duvic M, Kuzel T, Horwitz S, Demierre MF, Myskowski P, Steckel S. Results of a phase II trial of oral bexarotene (Targretin) combined with interferon alfa-2b (Intron-A) for patients with cutaneous T-cell

lymphoma. *Cancer*. 1 maggio 2007;109(9):1799–803.

28. Zackheim HS, Amin S, Kashani-Sabet M, McMillan A. Prognosis in cutaneous T-cell lymphoma by skin stage: long-term survival in 489 patients. *J Am Acad Dermatol*. marzo 1999;40(3):418–25.

29. Yu JB, Blitzblau RC, Decker RH, Housman DM, Wilson LD. Analysis of primary CD30+ cutaneous lymphoproliferative disease and survival from the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 marzo 2008;26(9):1483–8.

30. Pimpinelli N, Santucci M, Bosi A, Moretti S, Vallecchi C, Messori A, Giannotti B. Primary cutaneous follicular centre-cell lymphoma--a lymphoproliferative disease with favourable prognosis. *Clin Exp Dermatol*. gennaio 1989;14(1):12–9.

31. Bouaziz JD, Bastuji-Garin S, Poszepczynska-Guigné E, Wechsler J, Bagot M. Relative frequency and survival of patients with primary cutaneous lymphomas: data from a single-centre study of 203 patients. *Br J Dermatol*. giugno 2006;154(6):1206–7.

32. Cutaneous T cell lymphoma. *Nat Rev Dis Primer*. 26 agosto 2021;7(62).

33. Alibert JL. Monographie des dermatoses, ou précis théorique et pratique des maladies de la peau. Chez le Docteur Daynac, éditeur; 1832. 872 pag.

34. Mahalingam M, Reddy VB. Mycosis Fungoides, Then and Now... Have We Travelled? *Adv Anat Pathol*. novembre 2015;22(6):376–83.

35. Cerroni L. Mycosis fungoides-clinical and histopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg*. marzo 2018;37(1):2–10.

36. Fink-Puches R, Chott A, Ardigó M, Simonitsch I, Ferrara G, Kerl H, Cerroni L. The spectrum of cutaneous lymphomas in patients less than 20 years of age. *Pediatr Dermatol.* ottobre 2004;21(5):525–33.
37. Chang Su, Kevin A Nguyen, Harrison X Bai, Ya Cao, Yongguang Tao, Rong Xiao. Racial disparity in mycosis fungoides: An analysis of 4495 cases from the US National Cancer Database. 2017;77(3):497-502.e2.
38. Tan RS, Butterworth CM, McLaughlin H, Malka S, Samman PD. Mycosis fungoides--a disease of antigen persistence. *Br J Dermatol.* dicembre 1974;91(6):607–16.
39. Beyer M, Möbs M, Humme D, Sterry W. Pathogenesis of Mycosis fungoides. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG.* agosto 2011;9(8):594–8.
40. Magro CM, Dyrsen ME. Cutaneous lymphocyte antigen expression in benign and neoplastic cutaneous B- and T-cell lymphoid infiltrates. *J Cutan Pathol.* novembre 2008;35(11):1040–9.
41. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sézary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood.* 5 agosto 2010;116(5):767–71.
42. Kallinich T, Mucche JM, Qin S, Sterry W, Audring H, Kroczeck RA. Chemokine receptor expression on neoplastic and reactive T cells in the skin at different stages of mycosis fungoides. *J Invest Dermatol.* novembre 2003;121(5):1045–52.
43. Sokolowska-Wojdylo M, Wenzel J, Gaffal E, Lenz J, Speuser P, Erdmann S, Abuzahra F, Bowman E, Roszkiewicz J, Bieber T, Tüting T. Circulating

clonal CLA(+) and CD4(+) T cells in Sézary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7. *Br J Dermatol.* febbraio 2005;152(2):258–64.

44. Surh CD, Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity.* 19 dicembre 2008;29(6):848–62.

45. Sommer VH, Clemmensen OJ, Nielsen O, Wasik M, Lovato P, Brender C, Eriksen KW, Woetmann A, Kaestel CG, Nissen MH, Ropke C, Skov S, Ødum N. In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia.* luglio 2004;18(7):1288–95.

46. Goteri G, Filosa A, Mannello B, Stramazzotti D, Rupoli S, Leoni P, Fabris G. Density of neoplastic lymphoid infiltrate, CD8⁺ T cells, and CD1a⁺ dendritic cells in mycosis fungoides. *J Clin Pathol.* giugno 2003;56(6):453–8.

47. Hoppe RT, Medeiros LJ, Warnke RA, Wood GS. CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes influence the long-term survival of patients with mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* marzo 1995;32(3):448–53.

48. Berger CL, Xu AL, Hanlon D, Lee C, Schechner J, Glusac E, Christensen I, Snyder E, Holloway V, Tigelaar R, Edelson RL. Induction of human tumor-loaded dendritic cells. *Int J Cancer.* 15 febbraio 2001;91(4):438–47.

49. Zoi-Toli O, Vermeer MH, De Vries E, Van Beek P, Meijer CJ, Willemze R. Expression of Fas and Fas-ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL. *Br J Dermatol.* agosto 2000;143(2):313–9.

50. Ni X, Hazarika P, Zhang C, Talpur R, Duvic M. Fas ligand expression by neoplastic T lymphocytes mediates elimination of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in mycosis fungoides: a potential mechanism of tumor immune escape? *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* settembre 2001;7(9):2682–92.
51. Dereure O, Portales P, Clot J, Guilhou JJ. Decreased expression of Fas (APO-1/CD95) on peripheral blood CD4+ T lymphocytes in cutaneous T-cell lymphomas. *Br J Dermatol.* dicembre 2000;143(6):1205–10.
52. Querfeld C, Zain J, Rosen ST. Primary Cutaneous T-Cell Lymphomas: Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Cancer Treat Res.* 2019;176:225–48.
53. Van Doorn R, van Kester MS, Dijkman R, Vermeer MH, Mulder AA, Szuhai K, Knijnenburg J, Boer JM, Willemze R, Tensen CP. Oncogenomic analysis of mycosis fungoides reveals major differences with Sézary syndrome. *Blood.* 1 gennaio 2009;113(1):127–36.
54. Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev.* 15 ottobre 1999;13(20):2658–69.
55. Kamstrup MR, Gjerdrum LMR, Biskup E, Lauenborg BT, Ralfkiaer E, Woetmann A, Ødum N, Gniadecki R. Notch1 as a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.* 7 ottobre 2010;116(14):2504–12.
56. Clark RA, Watanabe R, Teague JE, Schlapbach C, Tawa MC, Adams N, Dorosario AA, Chaney KS, Cutler CS, Leboeuf NR, Carter JB, Fisher DC, Kupper TS. Skin effector memory T cells do not recirculate and provide immune protection in alemtuzumab-treated CTCL patients. *Sci Transl Med.* 18 gennaio 2012;4(117):117ra7.

57. Cerroni L, Rieger E, Hödl S, Kerl H. Clinicopathologic and immunologic features associated with transformation of mycosis fungoides to large-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* giugno 1992;16(6):543–52.
58. Epstein EH, Levin DL, Croft JD, Lutzner MA. Mycosis fungoides. Survival, prognostic features, response to therapy, and autopsy findings. *Medicine (Baltimore).* gennaio 1972;51(1):61–72.
59. Muñoz-González H, Molina-Ruiz AM, Requena L. Clinicopathologic Variants of Mycosis Fungoides. *Actas Dermosifiliogr.* aprile 2017;108(3):192–208.
60. Hodak E, Amitay-Laish I. Mycosis fungoides: A great imitator. *Clin Dermatol.* giugno 2019;37(3):255–67.
61. Gerami P, Rosen S, Kuzel T, Boone SL, Guitart J. Folliculotropic mycosis fungoides: an aggressive variant of cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol.* giugno 2008;144(6):738–46.
62. Lehman JS, Cook-Norris RH, Weed BR, Weenig RH, Gibson LE, Weaver AL, Pittelkow MR. Folliculotropic mycosis fungoides: single-center study and systematic review. *Arch Dermatol.* giugno 2010;146(6):607–13.
63. Wieser I, Wang C, Alberti-Violetti S, Lyons G, Tran C, Talpur R, Duvic M. Clinical characteristics, risk factors and long-term outcome of 114 patients with folliculotropic mycosis fungoides. *Arch Dermatol Res.* agosto 2017;309(6):453–9.
64. Hodak E, Amitay-Laish I, Feinmesser M, Davidovici B, David M, Zvulunov A, Pavlotsky F, Yaniv I, Avrahami G, Ben-Amitai D. Juvenile mycosis fungoides: cutaneous T-cell lymphoma with frequent follicular involvement.

J Am Acad Dermatol. giugno 2014;70(6):993–1001.

65. Boulos S, Vaid R, Aladily TN, Ivan DS, Talpur R, Duvic M. Clinical presentation, immunopathology, and treatment of juvenile-onset mycosis fungoides: a case series of 34 patients. J Am Acad Dermatol. dicembre 2014;71(6):1117–26.

66. Hodak E, Amitay-Laish I, Atzmony L, Prag-Naveh H, Yanichkin N, Barzilai A, Kershenovich R, Feinmesser M. New insights into folliculotropic mycosis fungoides (FMF): A single-center experience. J Am Acad Dermatol. agosto 2016;75(2):347–55.

67. Gerami P, Guitart J. The spectrum of histopathologic and immunohistochemical findings in folliculotropic mycosis fungoides. Am J Surg Pathol. settembre 2007;31(9):1430–8.

68. Van Santen S, Roach REJ, van Doorn R, Horváth B, Bruijn MS, Sanders CJG, de Pooter JC, van Rossum MM, de Haas ERM, Veraart JCJM, Bekkenk MW, Vermeer MH, Willemze R. Clinical Staging and Prognostic Factors in Folliculotropic Mycosis Fungoides. JAMA Dermatol. 1 settembre 2016;152(9):992–1000.

69. Haghghi B, Smoller BR, LeBoit PE, Warnke RA, Sander CA, Kohler S. Pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp disease): an immunophenotypic, molecular, and clinicopathologic study. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc. maggio 2000;13(5):502–10.

70. Steffen C. Ketron-Goodman disease, Woringer-Kolopp disease, and pagetoid reticulosis. Am J Dermatopathol. febbraio 2005;27(1):68–85.

71. Kempf W, Ostheeren-Michaelis S, Paulli M, Lucioni M, Wechsler J, Audring H, Assaf C, Rüdiger T, Willemze R, Meijer CJLM, Berti E, Cerroni

L, Santucci M, Hallermann C, Berneburg M, Chimenti S, Robson A, Marschalko M, Kazakov DV, Petrella T, Fraitag S, Carlotti A, Courville P, Laeng H, Knobler R, Golling P, Dummer R, Burg G, Cutaneous Lymphoma Histopathology Task Force Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. Granulomatous mycosis fungoides and granulomatous slack skin: a multicenter study of the Cutaneous Lymphoma Histopathology Task Force Group of the European Organization For Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Arch Dermatol.* dicembre 2008;144(12):1609–17.

72. Van Haselen CW, Toonstra J, van der Putte SJ, van Dongen JJ, van Hees CL, van Vloten WA. Granulomatous slack skin. Report of three patients with an updated review of the literature. *Dermatol Basel Switz.* 1998;196(4):382–91.

73. Clarijs M, Poot F, Laka A, Pirard C, Bourlond A. Granulomatous slack skin: treatment with extensive surgery and review of the literature. *Dermatol Basel Switz.* 2003;206(4):393–7.

74. Willemze R. Mycosis fungoides variants-clinicopathologic features, differential diagnosis, and treatment. *Semin Cutan Med Surg.* marzo 2018;37(1):11–7.

75. Amorim GM, Niemeyer-Corbellini JP, Quintella DC, Cuzzi T, Ramos-E-Silva M. Hypopigmented mycosis fungoides: a 20-case retrospective series. *Int J Dermatol.* marzo 2018;57(3):306–12.

76. Pavlovsky L, Mimouni D, Amitay-Laish I, Feinmesser M, David M, Hodak E. Hyperpigmented mycosis fungoides: an unusual variant of cutaneous T-cell lymphoma with a frequent CD8+ phenotype. *J Am Acad Dermatol.* luglio 2012;67(1):69–75.

77. Neill SM, Monk BE, du Vivier A. Mycosis fungoides associated with acanthosis nigricans. *J R Soc Med.* gennaio 1985;78(1):79–81.
78. Azizpour A, Ghanadan A, Nasimi M, Etesami I. Psoriasiform mycosis fungoides: a rare form of the disease with review of the literature. *Dermatol Online J.* 15 settembre 2017;23(9):13030/qt9mv8r0j7.
79. Nofal A, Salah E. Acquired poikiloderma: proposed classification and diagnostic approach. *J Am Acad Dermatol.* settembre 2013;69(3):e129-140.
80. Jang MS, Kang DY, Park JB, Han SH, Lee KH, Kim JH, Ko JW, Suh KS. Clinicopathological Manifestations of Ichthyosiform Mycosis Fungoides. *Acta Derm Venereol.* gennaio 2016;96(1):100–1.
81. Massone C, Kodama K, Kerl H, Cerroni L. Histopathologic features of early (patch) lesions of mycosis fungoides: a morphologic study on 745 biopsy specimens from 427 patients. *Am J Surg Pathol.* aprile 2005;29(4):550–60.
82. Wilcox RA. Cutaneous T-cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* ottobre 2017;92(10):1085–102.
83. Ea O. Evaluation, Diagnosis, and Staging of Cutaneous Lymphoma. *Dermatol Clin.* ottobre 2015;33(4):643–54.
84. Vergier B, de Muret A, Beylot-Barry M, Vaillant L, Ekouevi D, Chene G, Carlotti A, Franck N, Dechelotte P, Souteyrand P, Courville P, Joly P, Delaunay M, Bagot M, Grange F, Fraitag S, Bosq J, Petrella T, Durlach A, De Mascarel A, Merlio JP, Wechsler J. Transformation of mycosis fungoides: clinicopathological and prognostic features of 45 cases. French Study Group of Cutaneous Lymphomas. *Blood.* 1 aprile 2000;95(7):2212–8.
85. Yumeen S, Girardi M. Insights Into the Molecular and Cellular

Underpinnings of Cutaneous T Cell Lymphoma. *Yale J Biol Med.* marzo 2020;93(1):111–21.

86. Schrader AMR, Jansen PM, Willemze R. TOX expression in cutaneous T-cell lymphomas: an adjunctive diagnostic marker that is not tumour specific and not restricted to the CD4(+) CD8(-) phenotype. *Br J Dermatol.* agosto 2016;175(2):382–6.

87. Hodak E, David M, Maron L, Aviram A, Kaganovsky E, Feinmesser M. CD4/CD8 double-negative epidermotropic cutaneous T-cell lymphoma: an immunohistochemical variant of mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* agosto 2006;55(2):276–84.

88. Pimpinelli N, Olsen EA, Santucci M, Vonderheid E, Haeffner AC, Stevens S, Burg G, Cerroni L, Dreno B, Glusac E, Guitart J, Heald PW, Kempf W, Knobler R, Lessin S, Sander C, Smoller BS, Telang G, Whittaker S, Iwatsuki K, Obitz E, Takigawa M, Turner ML, Wood GS, International Society for Cutaneous Lymphoma. Defining early mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol.* dicembre 2005;53(6):1053–63.

89. Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, Duvic M, Prince HM, Lessin SR, Wood GS, Willemze R, Demierre MF, Pimpinelli N, Bernengo MG, Ortiz-Romero PL, Bagot M, Estrach T, Guitart J, Knobler R, Sanches JA, Iwatsuki K, Sugaya M, Dummer R, Pittelkow M, Hoppe R, Parker S, Geskin L, Pinter-Brown L, Girardi M, Burg G, Ranki A, Vermeer M, Horwitz S, Heald P, Rosen S, Cerroni L, Dreno B, Vonderheid EC, International Society for Cutaneous Lymphomas, United States Cutaneous Lymphoma Consortium, Cutaneous Lymphoma Task Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task

Force of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 giugno 2011;29(18):2598–607.

90. Hristov AC, Tejasvi T, Wilcox RA. Mycosis fungoides and Sézary syndrome: 2019 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. settembre 2019;94(9):1027–41.

91. Scheffer E, Meijer CJ, Van Vloten WA. Dermatopathic lymphadenopathy and lymph node involvement in mycosis fungoides. *Cancer*. 1 gennaio 1980;45(1):137–48.

92. Sausville EA, Worsham GF, Matthews MJ, Makuch RW, Fischmann AB, Schechter GP, Gazdar AF, Bunn PA. Histologic assessment of lymph nodes in mycosis fungoides/Sézary syndrome (cutaneous T-cell lymphoma): clinical correlations and prognostic import of a new classification system. *Hum Pathol*. novembre 1985;16(11):1098–109.

93. Clendenning WE, Rappaport HW. Report of the Committee on Pathology of Cutaneous T Cell Lymphomas. *Cancer Treat Rep*. aprile 1979;63(4):719–24.

94. Scarisbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P, Horwitz S, Porcu P, Stadler R, Wood GS, Beylot-Barry M, Pham-Ledard A, Foss F, Girardi M, Bagot M, Michel L, Battistella M, Guitart J, Kuzel TM, Martinez-Escala ME, Estrach T, Papadavid E, Antoniou C, Rigopoulos D, Nikolaou V, Sugaya M, Miyagaki T, Gniadecki R, Sanches JA, Cury-Martins J, Miyashiro D, Servitje O, Muniesa C, Berti E, Onida F, Corti L, Hodak E, Amitay-Laish I, Ortiz-Romero PL, Rodríguez-Peralto JL, Knobler R, Porkert S, Bauer W, Pimpinelli N, Grandi V, Cowan R, Rook A, Kim E, Pileri A, Patrizi A, Pujol RM, Wong H, Tyler K, Stranzenbach R, Querfeld C, Fava P, Maule M, Willemze R, Evison F, Morris S, Twigger R, Talpur R, Kim J, Ognibene G, Li S, Tavallae M, Hoppe RT, Duvic M, Whittaker SJ, Kim YH. Cutaneous Lymphoma International Consortium Study of Outcome in

Advanced Stages of Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Effect of Specific Prognostic Markers on Survival and Development of a Prognostic Model. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 novembre 2015;33(32):3766–73.

95. Kamijo H, Miyagaki T. Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Updates and Review of Current Therapy. *Curr Treat Options Oncol*. 7 gennaio 2021;22(2):10.

96. Kaye FJ, Bunn PA, Steinberg SM, Stocker JL, Ihde DC, Fischmann AB, Glatstein EJ, Schechter GP, Phelps RM, Foss FM. A randomized trial comparing combination electron-beam radiation and chemotherapy with topical therapy in the initial treatment of mycosis fungoides. *N Engl J Med*. 28 dicembre 1989;321(26):1784–90.

97. Shipman AR, Scarisbrick J. New Treatment Options for Mycosis Fungoides. *Indian J Dermatol*. febbraio 2016;61(1):119. 98. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part II. Prognosis, management, and future directions. *J Am Acad Dermatol*. febbraio 2014;70(2):223; 240–2.

99. Lindahl LM, Fenger-Grøn M, Iversen L. Secondary cancers, comorbidities and mortality associated with nitrogen mustard therapy in patients with mycosis fungoides: a 30-year population-based cohort study. *Br J Dermatol*. marzo 2014;170(3):699–704.

100. Assaf C, Bagot M, Dummer R, Duvic M, Gniadecki R, Knobler R, Ranki A, Schwandt P, Whittaker S. Minimizing adverse side-effects of oral bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma: an expert opinion. *Br J Dermatol*. agosto 2006;155(2):261–6.

101. Duvic M, Hymes K, Heald P, Breneman D, Martin AG, Myskowski P, Crowley C, Yocum RC, Bexarotene Worldwide Study Group. Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma: multinational phase II-III trial results. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 maggio 2001;19(9):2456–71.
102. Duvic M, Martin AG, Kim Y, Olsen E, Wood GS, Crowley CA, Yocum RC, Worldwide Bexarotene Study Group. Phase 2 and 3 clinical trial of oral bexarotene (Targretin capsules) for the treatment of refractory or persistent early-stage cutaneous T-cell lymphoma. *Arch Dermatol*. maggio 2001;137(5):581–93.
103. Gniadecki R, Assaf C, Bagot M, Dummer R, Duvic M, Knobler R, Ranki A, Schwandt P, Whittaker S. The optimal use of bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol*. settembre 2007;157(3):433–40.
104. Whittaker S, Ortiz P, Dummer R, Ranki A, Hasan B, Meulemans B, Gellrich S, Knobler R, Stadler R, Karrasch M. Efficacy and safety of bexarotene combined with psoralen-ultraviolet A (PUVA) compared with PUVA treatment alone in stage IB-IIA mycosis fungoides: final results from the EORTC Cutaneous Lymphoma Task Force phase III randomized clinical trial (NCT00056056). *Br J Dermatol*. settembre 2012;167(3):678–87.
105. Funk A, Hensley F, Krempien R, Neuhof D, Van Kampen M, Treiber M, Roeder F, Timke C, Herfarth K, Helmbold P, Debus J, Bischof M. Palliative total skin electron beam therapy (TSEBT) for advanced cutaneous T-cell lymphoma. *Eur J Dermatol EJD*. giugno 2008;18(3):308–12.
106. Huber MA, Kunzi-Rapp K, Staib G, Scharffetter-Kochanek K. Management of refractory early-stage cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides) with a combination of oral bexarotene and psoralen plus ultraviolet bath therapy. *J Am Acad Dermatol*. marzo 2004;50(3):475–6.

107. Photiou L, van der Weyden C, McCormack C, Miles Prince H. Systemic Treatment Options for Advanced-Stage Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Curr Oncol Rep.* 23 marzo 2018;20(4):32.
108. Suchin KR, Cassin M, Gottlieb SL, Sood S, Cucchiara AJ, Vonderheid EC, Rook AH. Increased interleukin 5 production in eosinophilic Sézary syndrome: regulation by interferon alfa and interleukin 12. *J Am Acad Dermatol.* gennaio 2001;44(1):28–32.
109. J J Scarisbrick, P Taylor, U Holtick, Y Makar, K Douglas, G Berlin, E Juvonen, S Marshall. U.K. consensus statement on the use of extracorporeal photopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease. *aprile 2008;158(4):659–78.*
110. Sanford KW, Anderson J, Roseff S, McPherson RA. Iron Deficiency Anemia in Patients Undergoing Extracorporeal Photopheresis for Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Lab Med.* 1 gennaio 2019;50(1):29–33.
111. Quaglino P, Maule M, Prince HM, Porcu P, Horwitz S, Duvic M, Talpur R, Vermeer M, Bagot M, Guitart J, Papadavid E, Sanches JA, Hodak E, Sugaya M, Berti E, Ortiz-Romero P, Pimpinelli N, Servitje O, Pileri A, Zinzani PL, Estrach T, Knobler R, Stadler R, Fierro MT, Alberti Violetti S, Amitay-Laish I, Antoniou C, Astrua C, Chaganti S, Child F, Combalia A, Fabbro S, Fava P, Grandi V, Jonak C, Martinez-Escala E, Kheterpal M, Kim EJ, McCormack C, Miyagaki T, Miyashiro D, Morris S, Muniesa C, Nikolaou V, Ognibene G, Onida F, Osella-Abate S, Porkert S, Postigo-Llorente C, Ram-Wolff C, Ribero S, Rogers K, Sanlorenzo M, Stranzenbach R, Spaccarelli N, Stevens A, Zugna D, Rook AH, Geskin LJ, Willemze R, Whittaker S, Hoppe R, Scarisbrick J, Kim Y. Global patterns of care in advanced stage mycosis fungoides/Sézary syndrome: a multicenter retrospective follow-up study from the Cutaneous Lymphoma International

Consortium. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 marzo 2019;30(3):494.

112. O'Connor OA, Pro B, Pinter-Brown L, Bartlett N, Popplewell L, Coiffier B, Lechowicz MJ, Savage KJ, Shustov AR, Gisselbrecht C, Jacobsen E, Zinzani PL, Furman R, Goy A, Haioun C, Crump M, Zain JM, Hsi E, Boyd A, Horwitz S. Pralatrexate in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: results from the pivotal PROPEL study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 marzo 2011;29(9):1182–9.

113. Foss FM, Girardi M. Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am*. aprile 2017;31(2):297–315.

114. Akpek G, Koh HK, Bogen S, O'Hara C, Foss FM. Chemotherapy with etoposide, vincristine, doxorubicin, bolus cyclophosphamide, and oral prednisone in patients with refractory cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer*. 1 ottobre 1999;86(7):1368–76.

115. Trautinger F, Eder J, Assaf C, Bagot M, Cozzio A, Dummer R, Gniadecki R, Klemke CD, Ortiz-Romero PL, Papadavid E, Pimpinelli N, Quaglino P, Ranki A, Scarisbrick J, Stadler R, Väkevä L, Vermeer MH, Whittaker S, Willemze R, Knobler R. European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome - Update 2017. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. maggio 2017;77:57–74.

116. Wu PA, Kim YH, Lavori PW, Hoppe RT, Stockerl-Goldstein KE. A meta-analysis of patients receiving allogeneic or autologous hematopoietic stem cell transplant in mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. agosto 2009;15(8):982–90.

117. Hughes CFM, Khot A, McCormack C, Lade S, Westerman DA, Twigger R,

Buelens O, Newland K, Tam C, Dickinson M, Ryan G, Ritchie D, Wood C, Prince HM. Lack of durable disease control with chemotherapy for mycosis fungoides and Sézary syndrome: a comparative study of systemic therapy. *Blood*. 1 gennaio 2015;125(1):71–81.

118. Pierce, J.M.R.; Mehta, A. Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Role of CD30 in Lymphoma. *Expert Rev. Hematol.* 2017, 10, 29–37.[CrossRef]

119. Kampa, F.; Mitteldorf, C. A Review of CD30 Expression in Cutaneous Neoplasms. *J. Cutan. Pathol.* 2021, 48, 495–510. [CrossRef]

120. Kim, Y.H.; Tavallae, M.; Sundram, U.; Salva, K.A.; Wood, G.S.; Li, S.; Rozati, S.; Nagpal, S.; Krathen, M.; Reddy, S.; et al. Phase II Investigator-Initiated Study of Brentuximab Vedotin in Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome With Variable CD30 Expression Level: A Multi-Institution Collaborative Project. *J. Clin. Oncol.* 2015, 33, 3750–3758. [CrossRef]

121. Duvic, M.; Tetzlaff, M.T.; Gangar, P.; Clos, A.L.; Sui, D.; Talpur, R. Results of a Phase II Trial of Brentuximab Vedotin for CD30+ Cutaneous T-Cell Lymphoma and Lymphomatoid Papulosis. *J. Clin. Oncol.* 2015, 33, 3759–3765. [CrossRef]

122. Prince, H.M.; Kim, Y.H.; Horwitz, S.M.; Dummer, R.; Scarisbrick, J.; Quaglino, P.; Zinzani, P.L.; Wolter, P.; Sanches, J.A.; Ortiz- Romero, P.L.; et al. Brentuximab Vedotin or Physician's Choice in CD30-Positive Cutaneous T-Cell Lymphoma (ALCANZA): An International, Open-Label, Randomised, Phase 3, Multicentre Trial. *Lancet* 2017, 390, 555–566. [CrossRef]

123. Horwitz, S.M.; Scarisbrick, J.J.; Dummer, R.; Whittaker, S.; Duvic, M.; Kim, Y.H.; Quaglino, P.; Zinzani, P.L.; Bechter, O.; Eradat, H.; et al. Randomized Phase 3 ALCANZA Study of Brentuximab Vedotin vs Physician's Choice in Cutaneous T-Cell Lymphoma: Final Data. *Blood Adv.* 2021, 5, 5098–5106. [CrossRef]

124. Van Der Weyden, C.; Dickinson, M.; Whisstock, J.; Prince, H.M. Brentuximab Vedotin in T-Cell Lymphoma. *Expert Rev. Hematol.* 2019, 12, 5–19. [CrossRef] [PubMed]
125. Velasco, R.; Domingo-Domenech, E.; Sureda, A. Brentuximab-Induced Peripheral Neurotoxicity: A Multidisciplinary Approach to Manage an Emerging Challenge in Hodgkin Lymphoma Therapy. *Cancers* 2021, 13, 6125. [CrossRef]
126. Chen, R.; Hou, J.; Newman, E.; Kim, Y.; Donohue, C.; Liu, X.; Thomas, S.H.; Forman, S.J.; Kane, S.E. CD30 Downregulation, MMAE Resistance, and MDR1 Upregulation Are All Associated with Resistance to Brentuximab Vedotin. *Mol. Cancer Ther.* 2015, 14, 1376–1384. [CrossRef]
127. Dustin ML, Bivona TG, Philips MR. Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nature Immunol.* 2004;5:363–72.
128. Namita Kothary PharmD, Ida-Lina Diak PharmD, Allen Brinker MD, MPH, Shewit Bezabeh MD, MPH, Mark Avigan MD, CM, Gerald Dal Pan MD, MHS Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with efalizumab use in psoriasis patients
129. Kobayashi, H.; Griffiths, G.L.; Choyke, P.L. Near-Infrared Photoimmunotherapy: Photoactivatable Antibody-Drug Conjugates (ADCs). *Bioconjug. Chem.* 2020, 31, 28–36. [CrossRef]
130. Kato, T.; Wakiyama, H.; Furusawa, A.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Near Infrared Photoimmunotherapy; A Review of Targets for Cancer Therapy. *Cancers* 2021, 13, 2535. [CrossRef] [PubMed]
131. Silic-Benussi, M.; Saponeri, A.; Michelotto, A.; Russo, I.; Colombo, A.; Pelizzo, M.G.; Ciminale, V.; Alaibac, M. Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting the

Cutaneous Lymphocyte Antigen for Mycosis Fungoides. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2021, 21, 977–981. [CrossRef] [PubMed]

132. Nagaya, T.; Nakamura, Y.; Sato, K.; Harada, T.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Near Infrared Photoimmunotherapy of B-Cell Lymphoma. *Mol. Oncol.* 2016, 10, 1404–1414. [CrossRef] [PubMed]

RINGRAZIAMENTI

Le persone da ringraziare sono tante, per altrettanti motivi e arriverà il momento in cui il mio pensiero sarà rivolto solo a loro.

In questa pagina finale, però, sento di volermi dedicare questo spazio.

Quando stringerò in mano questo lavoro, con la corona finalmente sul capo, voglio poter apprezzare ciò che sono diventato, tutto ciò che è successo in questi sei anni ed esserne felice.

Voglio ringraziarmi per l'approccio che credo mi abbia contraddistinto, nel bene e nel male, per questi sei anni: un modo di vivere che non è stato focalizzato sui problemi ma sull'apprezzare e godere del percorso, in ogni suo passaggio.

Voglio ringraziarmi, se non per altro, per la costanza che mi ha permesso di raggiungere questo obiettivo e contestualmente, la consapevolezza di dover fare ancora molto, sia in ambito medico che nella vita di tutti i giorni per ritenermi realmente soddisfatto.

Voglio ringraziarmi per non aver mollato nei momenti brutti, quando tutto sembrava aver perso senso. Per essere riuscito a fare pace con me stesso, accettarmi e imparare a sorridere delle cose belle senza disprezzare quelle brutte.

Voglio ringraziarmi per aver capito che nulla ci è dato e tutto ci può essere tolto, dove in un mondo da privilegiati perdiamo di vista quanto poco ci basta per essere felici.

Voglio ringraziarmi, infine, per aver finalmente fatto un piccolo passo avanti in quello che è il mio unico scopo nella vita: una promessa che non ho intenzione di infrangere e che permette di dare un senso alle mie azioni e alle mie giornate.

Sarai orgogliosa di me.